

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Sanidad Animal



TESIS DOCTORAL

**Vacunación frente a la hemoncosis ovina con la proteína
recombinante Hc23**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Elshaima Mohamed Fawzi

Directores

Montserrat Cuquerella Ayensa
José María Alunda Rodríguez

Madrid, 2013



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Sanidad Animal

VACUNACIÓN FRENTE A LA HEMONCOSIS OVINA CON LA PROTEÍNA RECOMBINANTE Hc23

Elshaima Mohamed Fawzi

Licenciada en Veterinaria

Madrid, 2012



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Sanidad Animal

VACUNACIÓN FRENTE A LA HEMONCOSIS OVINA CON LA PROTEÍNA RECOMBINANTE Hc23

AUTORA: Elshaima Mohamed Fawzi

DIRECTORES: Prof. Dra. Montserrat Cuquerella Ayensa

Prof. Dr. José María Alunda Rodríguez

Madrid, 2012

1. INTRODUCTION AND OBJECTIVES

2. REVIEW OF LITERATURE

3. MATERIALS AND METHODS

4. RESULTADOS

5. DISCUSIÓN

6. CONCLUSIONES

7. BIBLIOGRAFÍA

AGRADECIMIENTOS

I. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

II. RESUMEN

III. SUMMARY

A mis padres

A mis hermanos

A mis sobrinos

ÍNDICE

IV. ANEXO

AGRADECIMIENTOS

Me ha sido difícil después de cuatro años, expresar en pocas líneas mi agradecimiento a todas aquellas personas que, con su colaboración, han hecho posible la realización de mi tesis doctoral.

A la Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria, por haber aceptado la realización de mis estudios dentro del programa de Doctorado en Ciencias Veterinarias.

De modo general, quisiera mostrar mi agradecimiento a todos los integrantes del Departamento de Sanidad Animal (Facultad de Veterinaria, UCM) por permitirme el uso de sus instalaciones, así como por la ayuda material y el apoyo recibido.

También quiero expresar mi profundo agradecimiento al Prof. Dr. José María Alunda, por su gran calidad científica y humana, que me abrió hace cuatro años las puertas de su grupo, dándome la oportunidad de tener una visión más amplia del mundo de la investigación. Su paciencia y dedicación han hecho posible la realización de esta tesis y le doy las gracias por todos los esfuerzos que ha hecho.

Mi más sincero agradecimiento a la Prof. Dra. Montserrat Cuquerella Ayensa por aceptarme para realizar esta tesis doctoral bajo su dirección. Por su paciencia, disponibilidad y generosidad para compartir su experiencia y amplio conocimiento conmigo y por el interés que ha manifestado por este trabajo y la cordial firmeza con la que lo ha dirigido y me ha guiado, tanto a nivel científico como personal.

Mi agradecimiento a la Prof. Dra. Concepción de la Fuente, por los consejos que me ha ofrecido y su disposición de colaboración conmigo.

A las personas del Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias, por su hospitalidad durante mi estancia allí. En especial al Dr. Basilio Valladares, a la Dra. Emma Carmelo Pascual y a la Dra. María Antonieta Quispe, por su gran colaboración en mi trabajo, por darme toda su confianza, apoyo y amistad. No podría olvidarme de los integrantes de su laboratorio, especialmente de Pilar Foronda Rodríguez, Cristina Pou, Nuria Pérez, Cristina González y María Ynigo por su compañía y su amistad.

Al Laboratorio de Genética (Facultad de Veterinaria, UCM) por su colaboración en este trabajo, de forma especial a Dña. Isabel Túpac Yupanqui y a Sosy Méndez por su ayuda en procesar mis secuencias y por su amistad.

Al Servicio de Genómica, Servicios Generales de Apoyo a la Investigación, Universidad de La Laguna, Tenerife. De forma especial a Dña. Ana Cristina, por su colaboración en el trabajo.

Al Centro de Genómica y Proteómica - Unidad de Proteómica (Facultad de Farmacia, UCM), por su colaboración en este trabajo, y de manera especial a la Dra. Lola Gutiérrez, que me ayudó a analizar mis secuencias proteómicas.

También me gustaría agradecer la ayuda recibida por el Prof. Dr. Pedro Girón Daviña, de la Escuela Universitaria de Estadística, UCM, por analizar la estadística de la investigación. A D. Andrés Guerrero Moreno, del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de Alimentos, por ayudarme a liofilizar las proteínas de esta tesis.

A Ruth Paramio, quien me ha permitido compartir mesa, técnicas y me ha enseñado mucho español.

A María Elena González Sánchez y María Jesús Corral Caridad por su constante apoyo moral tanto en los buenos como en los malos momentos, quienes me ofrecieron no sólo sus conocimientos y la inestimable ayuda sino también su amistad.

A Beatriz Rojas Moreno, técnico de laboratorio, por su apoyo en la preparación de las muestras, su ánimo y su cariño. También a todos los demás compañeros del laboratorio que han participado como tal, de manera desinteresada.

A José Gil Estevao por su desinteresada colaboración en el manejo de los animales y en los momentos más complicados de las labores propias de la fase experimental.

A todo el personal docente de las asignaturas de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, pues todos ellos, en uno u otro momento, me han demostrado su afecto.

También me gustaría agradecer la colaboración del matadero de Villarejo de Salvanés (Madrid), en especial al veterinario titular D. David Vilallonga Vázquez.

Un agradecimiento muy especial por la comprensión, paciencia y el ánimo recibidos por D. Mohamed Lemine Khattary y Dña. Rosa María Muñoz y darles las gracias por todo lo que hemos vivido juntos durante este tiempo.

A todos los que ocupan un lugar especial en mi vida (mi familia, mis jefes, mis amigas y mis estudiantes), que han sabido disculpar mi ausencia y siempre han tenido una palabra de ánimo.

A la Universidad Zagazig de Egipto, Facultad de Veterinaria, por haber facilitado la movilidad necesaria para desarrollar mi tesis doctoral en España.

Y por último, quiero agradecer al Ministerio de Economía y Competitividad, el haberme concedido una beca predoctoral y al soporte recibido del proyecto AGL2006-10589, sin el que esta tesis no hubiera sido posible.

A todos ellos, muchas gracias.

ÍNDICE

1. INTRODUCTION AND OBJECTIVES	1
2. REVIEW OF LITERATURE	4
2.1. Etiology	4
2.2. Economic importance of the disease	7
2.3. Distribution of <i>Haemonchus contortus</i>	9
2.4. Immune response to the infection	10
2.4.1. Immune response against GINs in ruminants	10
2.4.1.A. Breed	11
2.4.1.B. Age	13
2.4.1.C. Sex	14
2.4.2. Type of immune response	14
2.4.2.A. Cellular response against infection	16
2.4.2.B. Humoral response against infection	19
2.5. Vaccination against helminths	21
2.6. Vaccination against <i>Haemonchus contortus</i>	22
2.6.1. Natural antigens	23
2.6.2. Hidden antigens	24
2.6.3. Recombinant antigens	26
3. MATERIALS AND METHODS	29
3.1. Materials	29
3.1.1. Parasite	29
3.1.2. Animals	29
3.1.2.A. Lambs	29
3.1.2.B. Rabbits	29
3.1.3. Culture media and reagents	30
3.1.3.A. Bacterial strains	30
3.1.3.B. Bacterial culture media and buffers	30
3.1.3.C. Antibiotics	31
3.1.3.D. Vectors	31
3.1.3.E. Molecular weight markers (DNA, proteins) and kit	31
3.1.3.F. Other reagents	32
3.1.4. Equipments	35

3.2. Methods	37
3.2.1. Isolation of total RNA of <i>H. contortus</i>	37
3.2.1.A. Isolation with the illustra RNAspin mini isolation kit	37
3.2.1.B. Isolation using the maxwell RNA purification kit	37
3.2.1.C. Tri-Reagent Method	38
3.2.2. Quality assessment	38
3.2.3. Purification of mRNA	39
3.2.4. Construction of cDNA library of <i>H. contortus</i>	39
3.2.4.A. First-strand cDNA synthesis	40
3.2.4.B. Second-strand cDNA synthesis	40
3.2.4.C. Blunted cDNA termini	40
3.2.4.D. Ligation and phosphorylation of EcoR I ends	40
3.2.4.E. Digestion with Xho I	40
3.2.4.F. Size fractionation	41
3.2.4.G. Packaging protocol and titration of the library	41
3.2.4.H. Amplification of the library	42
3.2.5. Polymerase chain reaction (PCR)	42
3.2.6. Electrophoresis of nucleic acids (DNA and RNA)	43
3.2.7. DNA labelling with digoxigenin	43
3.2.8. Southern-blot for the labeled DNA with digoxigenin	44
3.2.9. Screening of cDNA library	44
3.2.10. Quality of cDNA <i>H. contortus</i> library	45
3.2.11. Determination of complete sequence of Hc23	46
3.2.12. Preparation of competent cells	46
3.2.13. Ligation of DNA fragments	47
3.2.14. Transformation of competent bacterial cells	48
3.2.15. DNA digestion with restriction endonuclease enzyme	49
3.2.16. PCR colony of <i>E. coli</i> cells	49
3.2.17. Minipreps	49
3.2.18. Expression of recombinant protein rHc23	49
3.2.18.A. Induction	49
3.2.18.B. Solubilization	50
3.2.18.C. Purification	51
3.2.19. Dialysis and lyophilisation	51
3.2.20. Affinity chromatography with S-hexyl glutathione	51

3.2.21. Elution of the protein from the membrane	52
3.2.22. Immunoaffinity chromatography	52
3.2.22.A. Purification of polyclonal antibodies	52
3.2.22.B. Coupling of purified Abs to sepharose column	53
3.2.22.C. Immunoaffinity chromatography	53
3.2.23. Sequence analysis	54
3.2.24. Experimental design and vaccination trial in lambs	54
3.2.25. Physiological and parasitological determinations	57
3.2.25.A. Fecal egg counts (FEC)	57
3.2.25.B. Fecal culture	57
3.2.25.C. Hematological analysis	57
3.2.25.D. Live body weight	57
3.2.25.E. Recovery of adult <i>H. contortus</i>	57
3.2.26. Preparation of antigens (ASE and LSE)	58
3.2.27. Anti-rHc23 hyperimmune serum	58
3.2.28. ELISA and Western blotting	59
3.2.28.A. ELISA	59
3.2.28.B. SDS-PAGE and Western blotting (WB)	59
3.2.29. Statistical analysis	60
4. RESULTADOS	61
4.1. Purificación de la proteína nativa Hc2	61
4.1.1. Elución de la proteína desde la membrana	62
4.1.2. Obtención de Hc23 mediante inmunoadsorción	63
4.2. Obtención (clonación y expresión) de la proteína recombinante Hc23	65
4.2.1. Obtención de una biblioteca de cADN de <i>H. contortus</i> (A)	66
4.2.1.A. Aislamiento de ARN total	66
4.2.1.B. Obtención de mRNA y síntesis de cADN	68
4.2.1.C. Fraccionamiento del cADN	69
4.2.1.D. Titulación de la genoteca	70
4.2.1.E. Amplificación de la genoteca de <i>H. contortus</i>	72
4.2.1. F. Determinación de la calidad de la biblioteca	72
4.2.2. PCR de las colonias de <i>E. coli</i> con el inserto (B)	73
4.2.3. Construcción de la sonda de ADN de la proteína Hc23	75
4.2.4. Southern-blot con sondas marcadas con dioxigenina	76
4.2.5. Clonación de Hc23 en el vector pGEM-T easy (C)	79

4.2.6. Liberación del inserto	80
4.2.7. Clonación en el vector de expresión pET-29 b (+)	82
4.2.8. Expresión de rHc23	83
4.2.9. Solubilización de rHc23	83
4.2.10. Purificación de rHc23	85
4.3. Caracterización de la proteína Hc23	87
4.4. Ensayo vacunal	92
4.4.1. Eliminación fecal de huevos	92
4.4.2. Carga parasitaria	98
4.4.3. Peso de los animales	101
4.4.4. Análisis hemáticos	102
4.4.4.A. Valor Hematocrito	102
4.4.4.B. Leucocitos	106
4.4.4.C. Respuesta eosinofílica periférica	109
4.4.5. Respuesta inmunitaria	113
4.4.5.A. ELISA	113
4.4.5.B. Western blotting	116
5. DISCUSIÓN	119
6. CONCLUSIONES	141
7. BIBLIOGRAFÍA	142
I. ÍNDICE DE ABREVIATURAS	165
II. RESUMEN	174
III. SUMMARY	177
IV. ANEXO	

1. INTRODUCTION

Sheep are considered to be one of the important livestock animals. They possess high efficiency in converting the poor ranges to meat, milk and high quality wool, in addition to their ability to live under a variety of intensive and extensive management conditions. All the parasite helminthes especially the gastrointestinal nematodes (GINs), are considered as one of the most relevant causes of economic loss in sheep meat production and wool industries worldwide.

Haemonchus contortus is a blood feeding nematode of sheep and goats distributed all over the world especially in tropics/subtropics regions. Infections exhibit a variety of clinical presentations; from acute cases with anemia, malabsorption, inappetence and even mortality especially in young lambs, to chronic forms mainly in older sheep characterized by the reduction in meat and milk production in addition to lower wool production and quality. Hemonchosis represents ~ 15% of all gastrointestinal diseases of small ruminants worldwide (<http://www.fao.org>) (Cantacessi *et al.*, 2010).

In the last decades, the control of GINs has been mainly based on the use of anthelmintics; however, the indiscriminate use of drugs, lack of strategic planning, drug rotation and unknowledge of the epidemiology of the process have provoked the widespread appearance of anthelmintic resistance including multiple drug resistance against the three major classes of anthelmintics [the benzimidazoles (BZs), imidothiazoles (LEV) and macrocyclic lactones (MLs)] this menacing the success of drug treatment programs (Kaminsky, 2003; Kaplan, 2004). Furthermore, concerns have been raised regarding the presence of chemical active residues both in food for human consumption and in the environment. Therefore, it is necessary to explore new alternative or complementary control methods among them, immunoprophylaxis.

In recent years, many types of antigens have been explored as potential vaccines against *H. contortus*; they have been divided according to their exposure to the host immune response in natural antigens (i.e. somatic antigen of *H. contortus* p26/23 and excretory and secretory antigens (E/S) (Schallig and Van Leeuwen, 1997; Domínguez-Torano *et al.*, 2000) and hidden antigens (i.e. H11; H-gal-GP) (Knox *et al.*, 2003; Smith and Zarlenga, 2006). The immunoprophylactic value of some of them has been shown.

In spite of the efficacy of these vaccinations, they are neither economical nor practical because they use the native form of the proteins and their recombinant counterparts fell behind the expectations. A low molecular weight fraction from adult *H. contortus* (p26/23) was used to vaccinate lambs under 6 months of age. Immunization apparently induced a notable degree of protection correlated with high levels of specific antibodies (Domínguez-Toraño *et al.*, 2000). To overcome the low concentration of the protective peptide in adult helminths a recombinant incomplete form (rHcp26/23) was cloned and expressed. However, immunization of lambs with the defective protein did not provoke any significant protection in lambs against the challenge with *H. contortus* (García-Coiradas *et al.*, 2010). Thus, the optimization of recombinant DNA technology is considered necessary to clone a complete copy of gene encoding Hc23 and express the protein in a convenient vector system for immunization purposes.

Objectives

1. Construction of a high quality *Haemonchus contortus* cDNA library.
2. Screening of the *H. contortus* cDNA library with the use of a combination of southern blot and PCR to determine the gene encoding the protein Hc23, cloning in a cloning vector and expression in a convenient vector system.
3. Purification and characterization of the recombinant Hc23 (rHc23).
4. Development of a new method of purification of the native protein (Hc23) from adult *H. contortus* of higher yield and less labor investment.
5. Evaluation of the immunoprophylactic value of Hc23 protein (recombinant and native forms) in lambs against the experimental infection by *H. contortus* using two types of adjuvant.

2. REVIEW OF LITERATURE

2.1. Etiology

Haemonchus contortus is a pathogenic gastrointestinal nematode infecting small ruminants (Roberts *et al.*, 2004). It is a blood feeding abomasal worm. It uses a lancet to disrupt abomasal mucosal tissue, thus allowing the blood to flow and be ingested. In non fatal infections, the parasite can remove up to one tenth of circulating erythrocyte volume per day and one fifth of circulating erythrocyte volume might be removed per day under heavy infections mainly in lambs (Bowman *et al.*, 2002).

This parasite belongs to the Kingdom: Animalia, Phylum: Nematoda, Class: Secernentea, Order: Strongylida, Family: Trichostrongyloidae, Genus: *Haemonchus* and Species: *Haemonchus contortus*. The parasite is cylindrical, has a cuticle with 3 layers (the external cortical layer, the middle or homogeneous layer, and the inner fibrous layer) which protects the parasite from adverse effects of digestive enzymes. The adult worm and L4 stages are haematophagous; thus the intestine filled with blood which wind with white ovary gave the nickname “barber pole” or “wire worm” to this species. Females are very prolific and can produce about 5000 eggs daily. Female length is about 18-30 mm and male is shorter than female, about 10-20 mm shorter. The male of this parasite is characterized with well developed copulatory bursa with asymmetrical dorsal lobe and Y shaped dorsal ray (Urquhart *et al.*, 2001; Kassai, 2002).



Figure 2.1. *Haemonchus contortus* male.
JPG, ICPVet research group, UCM.



Figure 2.2. Adult *Haemonchus contortus*
in abomasum.
JPG, ICPVet research group, UCM.

Haemonchus is one of the most important helminthes in cattle, sheep, and goats throughout the world (Gibbs and Herd, 1986), and considerable research has been conducted on the species, *H. contortus* (Rudolphi, 1803), *H. placei* (Place, 1893), and *H. similis* (Travassos, 1914) that are globally distributed in domesticated Bovinae and Caprinae. Another 7 species, *H. bedfordi* (Le Roux, 1929), *H. dinniki* (Sachs, Gibbons and Lweno, 1973), *H. horaki* (Lichtenfels, Pilitt, Gibbons and Boomker, 2001), *H. krugeri* (Ortlepp, 1964), *H. lawrencei* (Sandground, 1933), *H. mitchelli* (Le Roux, 1929) and *H. vegliai* (Le Roux, 1929) are species of wild Bovinae, Cephalophinae, Reduncinae, Aepycerotinae, Antilopinae, Alcelaphinae, and Caprinae in sub-Saharan Africa, whereas *H. okapiae* (van den Berghe, 1937) occurs in Giraffidae and *H. longistipes* (Railliet and Henry, 1909) are recognized in Camelidae and domestic sheep, goats, and rarely, cattle across a broader range extending from Africa to southern Eurasia (Gibbons, 1979; Jacquiet *et al.*, 1995; Lichtenfels *et al.*, 2001, 2002).

Sheep especially younger ones are more susceptible to the infection with haemonchosis especially after the onset of long rains due to fresh infection from the pasture (Gatongi *et al.*, 1998). Haemonchosis produces clinical disease distinguished by anorexia, anemia, edema and emaciation with digestive disturbance and blood loss. The loss of red blood cells results in decreasing in blood packed cell volume (PCV). It produces protein deficiency (hypoproteinaemia) which has the effect of weakening of host response and promoting the parasite survival. The death occurs in heavily infected sheep (Rahman and Collins, 1990; Fox, 1997; Hoste, 2001).

The parasite has a direct life cycle which has one part in the host and another part in the environment. Adult worm live in the abomasums, in which male mate the female, eggs are produced and pass out in the feces. The egg undergoes development to larvae (L1), passes through two feeding stages in the fecal material to become the non-feeding infective stage (L3). Third stage larva is more resistant to unfavorable conditions (the population would be decreased if unfavorable conditions are present). The L3 larvae are the longest lived and most resistant stage of the parasite which migrate to herbage and are ingested by sheep. The L3 larvae molts to two more stages to become adults with prepatent period from 15-21 days (Onyiah and Arslan, 2005). On occasion the life cycle inside the host is longer due to the hypobiosis of larvae in the abomasal mucosa. The hypobiotic larvae become active under suitable environment

conditions (Soulsby, 1982; Cox, 1993). The optimal temperature for larval development in the environment is 22-26 °C with humidity greater than 70% (Rossanigo and Gruner, 1995).

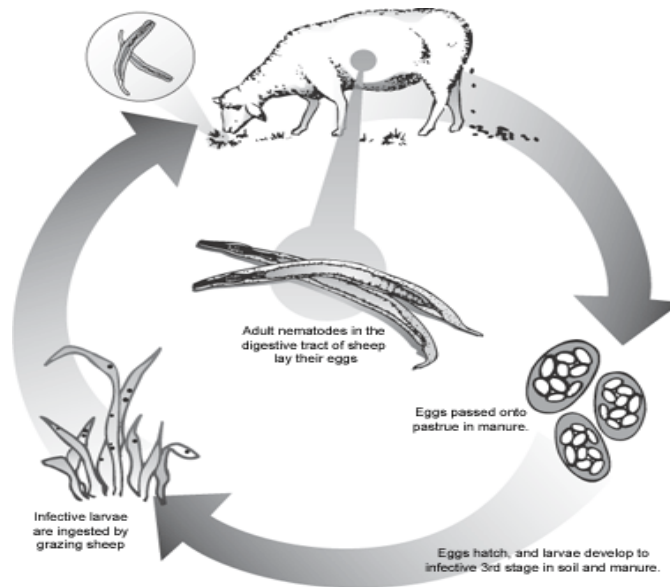


Figure 2.3. The biological life cycle of sheep parasitic nematode (*Haemonchus contortus*). <http://pubs.ext.vt.edu/410/410-027/410-027.html>

The pathological changes in sheep infected with *Haemonchus* include:

- Mucosal hyperplasia and abundant mucous secreting gastric cells and presence of hemorrhages on the mucosal surface of cardias and sometimes in the pyloric region due to the blood feeding habits of the parasite in addition to thickness increase of abomasal mucosa (Hunter and Mackenzie, 1982; Titchen, 1982; Scott *et al.*, 1999).
- Decreased acid production due to loss and/or decrease in the number of parietal cell function due to emergence of L4 larvae (Simpson *et al.*, 1997). It causes tissue lesion, cellular infiltration and cellular replacement by immature nonfunctional cells (Simpson, 2000; Mulcahy *et al.*, 2004).
- Absence of proteolytic pepsin as a result of rise of the stomach pH so no activation of pepsinogen occurs and its plasma level is increased (Malan

et al., 2001). Pepsinogen shows a significant increase from day 4 until 14 days postinfection and returns to preinfection levels at 40 days PI (Fox *et al.*, 1988; Fox and Jacobs, 1991).

- Movement of serum protein especially albumin and sodium from circulating blood to the lumen of abomasum (Rowe *et al.*, 1988; Knox *et al.*, 1993; Miller and Horohov, 2006).
- Decrease of the total erythrocyte count, hemoglobin (Hb) concentration (5.3-7.7 mg/dL) and PCV values which are attributed to abomasal bleeding due to blood feeding stages of parasite (L4 larvae and adult worm) as well as to blood loss through the intestine (Rowe *et al.*, 1988) and erythrocyte lysis caused by hemolytic factor excreted by the parasite (Fetterer and Rhoads, 1998).
- Eosinophilia and lymphocytosis might be attributed to response of the host immune system to antigenic stimulation or parasitic burden (Scott *et al.*, 1999; Terefe *et al.*, 2005).

In the necropsy, the macroscopic lesions include emaciation, pale mucous membranes, enlargement of lymph nodes, edema in the body cavity and thickening of abomasal mucosa with petechial hemorrhage (Quiroz, 1999; Urquhart *et al.*, 2001), besides presence of nodules and adult worm in the abomasums (Scott *et al.*, 1998). The microscopic lesion is characterized by hyperplasia of abomasal epithelium (Scott *et al.*, 1998), dilatation of the gastric glands, ulcers, hemorrhage, edema (Bendixsen *et al.*, 1995; Bricarello *et al.*, 2004) and cellular infiltration which is characterized by increased number of mastocytes, globule leukocytes and eosinophils (which are more concentrated in abomasal submucosa than in the mucosa) (Amarante *et al.*, 2005).

2.2. Economic importance of the disease

Haemonchus contortus has a wide range of clinical courses from acute, often fatal especially for young lambs, to chronic forms particularly in older lambs and sheep. The disease (haemonchosis) caused by this parasite represents ~15% of all gastrointestinal diseases of small ruminants worldwide with high economic losses (<http://www.fao.org>) (Cantacessi *et al.*, 2010). The disease has great economic

importance characterized by decreased production, increased cost of prophylaxis and treatment and death of infected animals in acute forms of the disease (Miller and Horohov, 2006). This parasite can provoke 30-50% of mortality in lambs and kids due to scarcity or absence of adequate control measures (Aumont *et al.*, 1997; Baker, 1997).

The production disorders present in the chronic subclinical infection include the weight loss, reduced weight gain, reproductive inefficiency (decreased fertility), reduction of wool growth and quality, and decline in the milk yield (Gross *et al.*, 1999).

The parasite has a notable effect on the live weight and carcass conversion (Wallace *et al.*, 1995). This is attributed to many factors such as irreversible loss of protein in the gastric lumen, hemorrhagic gastritis, decrease of digestive ability, decrease of appetite and decrease of the level of feed intake (Simcock *et al.*, 1999; Coop and Kyriazakis, 2001).

The control of the disease depend mainly on the use of anthelmintics which cost the world many millions of euros every year and high levels of anthelmintic resistance have been described in the major parasites including the species of genera *Ostertagia*, *Haemonchus* and *Trichostrongylus* (Amarante and Barbosa, 1995; Echevarria *et al.*, 1996; Waller, 1997; Kaplan, 2004). The appearance of anthelmintics resistance has become a common phenomenon including multiple drug resistance against the three major classes of anthelmintics [the benzimidazoles (BZs), imidothiazoles (LEV) and macrocyclic lactones (MLs)] which threat the successful chemotherapy (Jackson and Coop, 2000; Kaminsky, 2003; Wrigley *et al.*, 2006). The development of resistance in gastrointestinal nematodes (GINs) to the most used anthelmintic drugs in all parts of the world might be due to insufficient dose of selected drugs or inappropriate route of administration or use of ineffective compounds. The use of these drugs leads to accumulation of chemical residues in the meat of treated animals, it has a significant environmental impact, cost of therapy is high, it requires a very laborious work and management of pastures. As a consequence, it costs many millions of euros to control the GINs infection (Hertzberg and Bauer, 2000). In the last decades no new anthelmintics drugs have been introduced to the market, except the amino-acetonitrile derivatives (AADs) (a class of novel synthetic compounds) with activity against all

gastrointestinal nematodes, including the resistant ones (Ducray *et al.*, 2008; Kaminsky *et al.*, 2008).

2.3. Distribution of *Haemonchus contortus*

Haemonchus infections especially those caused by *H. contortus* are one of the major problems in tropics and subtropics regions (Waller *et al.*, 1996; Perry *et al.*, 2002). The nematode has great ability to overcome unfavorable conditions either in the host or in the environment so has wide distribution all over the world (Waller and Chandrawathani, 2005). The parasite is distributed in European countries of temperate climate (i.e. UK, Russia, Italy, Spain, Netherlands, France, Sweden, Denmark), South America (Brazil, Argentina, Costa Rica) (Jackson and Coop, 2000; Hoste *et al.*, 2002; Lindqvist *et al.*, 2001; Waller, 2006, others) in addition to its wide distribution in Africa as well as in the United States [i.e. South east and other areas of America so this parasite is considered the primary a menace to the production of small ruminants in much part of the United States (Fleming *et al.*, 2006)], Asia (Indonesia, India, etc...), (Eckert and Hertzberg, 1994; Newton, 1995; Dorny *et al.*, 1996; Miller and Horohov, 2006). Hunt *et al.* (2008) suggested that the spread of anthelmintic resistance and the transmission of the virulent genotypes between sheep and goats breeds, migration of parasite through livestock movement and deposition of feces during transportation of the flock helped in the spread of the parasite all over the world.

It is more prevalent in warm and humid areas. The egg development and survival of free living stages of *H. contortus* is affected mainly by the climatic conditions (i.e. humidity has the major effect on the development of infection since it helps to spread the infection and increase the survival of the parasite (Tembely *et al.*, 1997). The prevalence of infection during warmer and wetter grazing seasons might be attributed to the fact of sheep being more time on pasture for grazing, besides ineffective deworming practices or the development of the resistance to the anthelmintic drugs (Lindqvist *et al.*, 2001; Waller, 2006)).

Gatongi *et al.* (1998) determined that adult worms and hypobiotic larvae were found in proportions which varied with seasons. The highest percentage of hypobiotic larvae was found during the dry season. Hypobiosis allowed the survival of *H. contortus* during dry season and the high prevalence during the wet season.

2.4. Immune response to the infection

One of the strategies that play an important role to control infections by gastrointestinal nematodes (GINs) is the immune response (natural and acquired immunity) of the host which could be used as a selection method to increase the host population resistance.

Parasitism with GINs differs from the other infectious diseases. Infected animals seem to have some level of infection throughout the year (possibly during all their lives); whereas other infectious diseases infect the animals for short periods. It might be attributed to the type of immunity which is stimulated during infection for controlling infection; microbial infections cause an aggressive and prompt immune response while nematode infections cause varying forms of immunological tolerance to allow them to survive within the host (Maizels and Lawrence, 1991). This means that the development of immunity against GINs is generally slower and parasite are persisting and surviving in the pasture in where livestock graze so a constant exposure to the infection exists.

The immune response against GINs is very complex and the contribution of each component has a wide variation. The study of limited variables to predict the resistance against nematodes is not sufficient to know the role of every component in the development of the host resistance to the infection with GINs (Wakelin, 1995). Generally speaking the young growing ruminants are more susceptible to the infection than older ones, i.e. the development of the resistance to the infection does not develop before 8-14 months depending on the host, parasite species and virulence and environmental conditions (van Houtert and Sykes, 1996).

2.4.1. Immune response against GINs in ruminants

The host develops some degree of immunity after repeated natural infection during grazing which might eliminate the new larval infection or eliminate the existing one. Also can be developed immunity after experimental infection (Emery *et al.*, 1992; Stankiewicz *et al.*, 1996). Intestinal mucus has been proposed to trap infective larvae preventing their establishment (Rothwell, 1989). An increase in goblet cells is observed during the development of immunity against *Trichostrongylus colubriformis*, and these cells secrete mucus; also increase peristaltic movement due to local smooth muscle

hypertrophy, and hypercontractility causes rapid expulsion of nematodes (adults and larvae) (Tremain and Emery, 1994). Gut mucus has an important role in mediating the immune responses to GINs, by acting as inhibitory media, and as a vehicle for antibody and other effector cells secreted during the immune response (Miller, 1987). The loss of small intestinal epithelium during infection might help to dislodge and expel larvae (McClure *et al.*, 1992). Immune mediators such as tissue mast cell protease damage the epithelial cells leading to increased permeability and excess fluid into the lumen and this might facilitate the worm rejection (Miller, 1996).

Cross immunity might play a role as a mean of developing resistance among the different parasites especially GINs. It has been recorded a full immunity to *H. contortus* and against *T. colubriformis* (Jackson *et al.*, 1988). However, immunity developed more rapidly against *T. colubriformis* than against *H. contortus*. This phenomenon was effective in concurrent infections and was not observed in the case of nonspecific artificial infections (Balic *et al.*, 2000a).

2.4.1.A. Breed

Breed of sheep that are genetically resistant to GINs have identified in many cases. These breeds are recommended to produce more resistant ones either by crossbreeding or breed substitution which might result in an effective way to control infection of GINs (Miller *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2001). The choice of genetically resistant animals might aid in optimize the efficacy of anthelmintic used by delaying the development of anthelmintic resistance or help in the development of vaccination (González *et al.*, 2008). Fecal egg count (FEC) was the most common way used to select resistant breeds. PCV in the case of *H. contortus* is an important indicator of resistance (Taylor *et al.*, 1990). Recently, the host antibody, parasite antigen assays and DNA markers might provide new parameters for breed selection (Woolaston, 1992; Bisset *et al.*, 1996; Gray, 1997) in addition to the identification of specific genetic markers the quantitative trait locus (QTL) identification in the genome (Miller and Horohov, 2006) can be used for marker assisted selection of resistant breeds. Moreover other parameters (i.e. production of specific IgE antibodies, eosinophilia and mucosal mastocytosis) are considered to play a role in the expulsion of the worm (Miller, 1996).

In Germany, estimation of the genetic parameters of natural resistance in two breeds of sheep exposed to experimental infection with *H. contortus* concluded that Rhön sheep were more susceptible to infection than Merinoland sheep. Rhön breed had higher levels of anti-Hc L3 larval specific antibody but the Merinoland sheep had higher IgG antibody levels; however there were not significant differences between the 2 breeds in PCV, and worm burden (Gauly *et al.*, 2002).

The red Massai breed was found to show higher resistance to challenge infection with *H. contortus* than Dorper breed sheep, detected by lower FEC and significantly high PCV and eosinophilia (Wanyangu *et al.*, 1997). Manchego sheep breed and Merino breed (sheep breeds in Spain) were resistant after challenge infection with *H. contortus* with lower FEC and worm burden but the role of parasite specific IgG response was not clear (Gómez-Muñoz *et al.*, 1998). Similarly, the Canaria Hair breed sheep is more resistant to *H. contortus* infection than Canaria sheep breed (González *et al.*, 2008).

The Black Belly breed was reported to be more resistant to natural and experimental infection with *H. contortus* than Florida Native, Gulf Coast Native sheep, Suffolk, Rambouillet, Finn-Dorset breeds (Radhakrishnan *et al.*, 1972; Bradley *et al.*, 1973; Courtney *et al.*, 1985; Miller *et al.*, 1998). Similarly, Black Belly sheep are more resistant to infection with *H. contortus* than INRA 401 sheep breed. This was associated to lower FEC and worm burden in Black Belly breed but without significant effect in eosinophil counts (Aumont *et al.*, 2003). The Crioula Lanada breed showed greater resistance to natural infection with *H. contortus* than Corriedale sheep breed. This natural resistance was associated with lower FEC and worm burden, higher levels of PCV, total serum protein, albumin, eosinophils and globule leukocytes (Bricarello *et al.*, 2004).

Gamble and Zajac (1992) found that St. Croix lambs developed resistance early in life (8 wk of age) after challenge infection with *H. contortus* than Dorset lambs without consistent differences between breeds for most of the immune response parameters measured such as lymph proliferation, mast cells and eosinophils; sometimes the resistant breed had greater levels of abomasal mucosal globule leukocytes.

Amarante *et al.* (2004) concluded that the Santa Ines sheep had lower FEC and lower *H. contortus* worm burden than Suffolk and Île de France sheep so it was more resistant to infection than the other two breeds. Mast cells, globule leucocytes and histamine values were greatest in Île de France, intermediate in Suffolk and lowest in the Santa Ines sheep. These results indicated the unclear role of the inflammatory cells for the development of the resistant breeds. The three breeds of sheep showed an inverse relationship between FEC and IgA anti-L3 or IgA anti-L5 which indicated that IgA was involved in intra-breed variation in fecundity of *H. contortus*. Negative correlation coefficients also were present between worm burdens and IgA, except in Suffolk sheep (Amarante *et al.*, 2005).

2.4.1.B. Age

The immune system matures with age, so that young lambs harbor the heaviest infections, which is characterized by high FEC, and are subjected to clinical disease and severe signs of infection. In contrast, adult animal has mature and developed immune system so they harbor low infection levels with subclinical forms of the disease (Miller and Horohov, 2006).

Immunological system in young lambs under than 6 months of age is known as unresponsive or hyporesponsive (Weiss *et al.*, 1986); maturation is reached during the first 12 months of life (Watson and Gill, 1991). Lambs do not stimulate Th2 response and they show decreased number of eosinophils and mastocytes in abomasal mucosa (Urban *et al.*, 1992; Miller, 1996). The lack of Th2 response might be attributed to low numbers of CD4+ and CD8+ lymphocytes and high number of $\gamma\delta$ (gamma delta) T cells in blood and lymph (Hein and Mackay, 1991; Watson *et al.*, 1994). But it has been found that the young lambs have a relatively low IgA level after nematode infection (Smith *et al.*, 1985; Smith, 1988). In experimental infections, the level of specific anti-*Haemonchus* antibodies IgG, IgA and IgM did not show significant difference as compared to adult animal's response after infection (Schallig *et al.*, 1995).

Haemonchosis is more frequently in younger (below 9 months) sheep and goats than in older (above 9 months) animals (Haig *et al.*, 1989; Hendriks, 1990, Cuquerella *et al.*, 1991; Vlasoff *et al.*, 2001). Van Houtert and Sykes (1996) recorded that the development of maximal levels of immunity might be not developed until 8-14 months

old age is reached or later depending on a variety of host, parasite and environmental factors.

2.4.1.C. Sex

Males of many species are more susceptible to infection than females (Klein, 2000a). The cause that attributes the higher susceptibility to infection of males might be due to sex steroids, specifically androgens. Male androgen reduces immunocompetence and affects the behavior thus making the male more susceptible to the infection (Klein, 2000a, b). The resistance against *H. contortus* infection was not different among the male lambs and the difference was recorded among the female especially after challenge infection (i.e. Gómez-Muñoz *et al.*, 1998; Gauly *et al.*, 2002; Gauly *et al.*, 2006). However, in other cases higher prevalence of haemonchosis has been found in females when compared to males (Komoin *et al.*, 1999; Valcárcel and García Romero, 1999).

2.4.2. Type of immune response

The process of control/elimination of GINs from the host is considered very complex, which might be attributed to the combination between cellular and humoral immunity (Balic *et al.*, 2000a; Meeusen *et al.*, 2005). The effectiveness of the process of immunity is affected by many factors i.e. the age of animals (McClure *et al.*, 1998, 2000; Emery *et al.*, 2000; Macaldowie *et al.*, 2003), physiological status (Hoste *et al.*, 2005), genetic characteristics (Terefe *et al.*, 2007) and environmental conditions (O'Connor *et al.*, 2006, 2007). The induction of protective resistance or exacerbation of infections depends mainly on the types of cytokines produced during the infection (Urban *et al.*, 1991). Two types of cytokines gene expression have been found to be dependent on the immune response, Th1 which produces interferon gamma (IFN- γ), Tumor necrosis factor (TNF- α) and IL-2 (interleukin-2), which played role in case of viral and bacterial infections (Khan and Collins, 2004), and Th2. Th2 cells produce IL-3, IL-4, and IL-5 this suggesting its role in increased production, proliferation and differentiation of effector cells such as eosinophils, mastocytes and globule leukocytes (Miller and Horohov, 2006).

The immune response against infection with nematode depends mainly on Th2-type response. Some authors found that CD4+ T-cells were essential in the development

of the immunity against infection with nematodes. The depletion in CD4⁺ T-cells was clear during vaccination of lambs with gut antigens of *H. contortus* which did not develop protection due to the deficiency in these cells (Karanu *et al.*, 1997). Gill *et al.* (2000) reported that resistance in Merino breed infected with *H. contortus* showed decrease in abomasal and mesenteric lymph node lymphocytes, IFN- γ production and increase in IL-5 production at 5 and 28 days PI. In the case of Romney breed sheep infected with *T. colubriformis* animals showed increase of the production of IL-5, IL-13, and TNF- α , but not IL-4, IL-10, or IFN- γ , in intestinal lymph nodes cells after 21 days PI for the resistant breed (Pernthaner *et al.*, 2005).

There are two mechanisms for rejection of infection with GINs. The first is the rapid expulsion within 48 h of infection by larvae failing to penetrate the mucus layer. The effector cells that play a role in the primary infection are mast cells and globule leucocytes. The second mechanism is the delayed expulsion within 3-14 days which occurred when some larvae penetrated the host tissues; expulsion is mediated by eosinophils and constitutes a delayed hypersensitivity type 2 response (Meeusen, 1999).

The cytokines secreted during the infection are Th2 cells dependent with the relative absence of type 1 cytokines and is characterized by the stimulation of the production of mastocytosis, eosinophilia and the production of IgE and IgG1 (Else and Finkelman, 1998; Grecis, 2001; Gause *et al.*, 2003).

The specific host immune response was thought to be associated with stimulation of the MHC (Major Histocompatibility Complex) encoded receptors, to promote lymphocytes of various classes which boosted the production of cytokines. These cytokines stimulated the effector cells to eliminate the antigen. The two types of immunity, cellular and humoral, play a role in the rejection of nematodes infection: the production of antibody by B lymphocytes and the activation of cellular responses. In the case of GINs, surface or secreted/excreted antigens stimulated the Th2 subclass of helper T lymphocytes which produced a wide range of cytokines including IL-4, IL-5 and IL-10 this resulting in the activation of antibody mediated (humoral) effector mechanisms as well as inducing local mast cell and eosinophil proliferation (Meeusen, 1999).

After natural and experimental infection with *H. contortus*, in many studies a combined response with cellular infiltration in mucosa and regional lymph nodes followed by increase in CD4+, CD8+, $\gamma\delta$ and B lymphocytes has been observed (McClure *et al.*, 1996; Balic *et al.*, 2000b). CD4+ lymphocyte increase has been detected in abomasal mucosa and regional lymph nodes due to *H. contortus* infection; this suggested that these cells were aiding in the production of cytokines which regulated the cell differentiation and proliferation of circulating antibodies (Balic *et al.*, 2000b). CD8+ lymphocyte are recognized as regulatory cells of the immune system. B lymphocyte mediator of humoral immunity is considered in charge of antibody production which accumulated around the surface (Gill *et al.*, 1993b). An infiltration of CD4+ and $\gamma\delta$ -TCR+T (gamma delta -T-cell receptors) cells and B cells into abomasal mucosa of infected sheep with *H. contortus* were observed at 3 days PI and with high level of increase at 5 days PI (Balic *et al.*, 2002).

2.4.2.A. Cellular response against infection

Lymphocyte proliferation phenomenon has been recognized as a response to *H. contortus* infection; this suggested that increase of lymphocytes played some role in the innate host resistance to infection (Torgerson and Lloyd, 1992, 1993b) and in the development of host immunity against infection (Schallig and van Leeuwen, 1997). T lymphocytes are mediators of cellular immunity. Larval and adult stages of *H. contortus* infection induced peripheral lymphocyte proliferation and in lymph nodes, so they could be used as indicators to measure cellular response to the infection (Torgerson and Lloyd 1993a, b).

Many authors have suggested that increase of the number of eosinophils, mast cells and globule leukocytes during infection with GINs play an important role to control the disease (i.e. Dawkins *et al.*, 1989; Rothwell, 1989; Bricarello *et al.*, 2004). Apparently, breeding for resistance or susceptibility to GINs influences selectively some parameters of the cellular immune response (Pernthaner *et al.*, 1995). In the infection of sheep with *Teladorsagia circumcincta* larval antigens are associated with increased numbers of mucosal mast cells, globule leukocytes, eosinophils thus suggesting these cells correlated with the development of immunity (Stear *et al.*, 1995). The increased infiltration of eosinophils to abomasal mucosa after *H. contortus*

infection is more obvious in challenge infection than in the primary infection (Balic *et al.*, 2000b). Thus, a certain relationship between resistance and eosinophils seems to exist. These cells attack the L3 larvae when they reach the mucosa in which coalesce and surround L3 larvae causing cuticle damage and larval death (Balic *et al.*, 2006).

Eosinophils are stimulated either by tissue injury occurred as a result of nematode infection or by histamine released by mast cells (de Veer *et al.*, 2007). These cells contain granules filled with a number of cationic proteins and release pro-inflammatory cytokines, chemokines and lipid mediators (Rothenberg and Hogan, 2006). Also secrete large amounts of galectin-14 following the parasite infection (Dunphy *et al.*, 2002; Huntley *et al.*, 2005).

Pernthaner *et al.* (1995) reported that the blood eosinophil began to increase one week earlier in resistant than in susceptible sheep but without significant correlation between FEC and eosinophil counts in resistant lambs. However in susceptible lambs sometimes significant correlation between FEC and eosinophil was observed. Buddle *et al.* (1992) recorded negative correlation between blood eosinophil counts and FEC, which was associated with the development of sheep resistance to nematodes. However, studies in mice suggest that eosinophils were not required for protective immunity during the infection of mice with *Schistosoma mansoni* (Sher *et al.*, 1990), *Nippostrongylus brasiliensis* (Coffman *et al.*, 1989) or *Heligmosomoides polygyrus* (Urban *et al.*, 1991).

The IL-4 and IL-5 released by CD4⁺ and $\gamma\delta$ lymphocytes were attributed to the increased production of eosinophils from the bone marrow and were associated with their activation. These cells migrated toward the abomasal mucosa via blood, so it was associated with eosinophilia, which was considered as marker of helminth infections (Munn *et al.*, 1997; Klion and Nutman, 2004).

In experimental infections with *H. contortus* it has been recorded the appearance of eosinophils at 5th day PI reaching the peak between 2nd and 3rd weeks PI and the decline between 4th and 5th weeks PI (Gill, 1991; Stevenson *et al.*, 1994; Balic *et al.*, 2000a). In many studies, a negative correlation between eosinophils and worm burden and FEC has been found (Gill *et al.*, 1993b; Amarante *et al.*, 2005). Other authors recorded that these cells did not play any role in worm expulsion (Stear *et al.*, 2002).

Gill *et al.* (1993a) observed that the sheep eosinophilia was found in response to *H. contortus*, although without significant correlation between the eosinophils and FEC and worm burden. Amarante *et al.* (1999) concluded that eosinophils did not offer any advantage to select the resistant breeds. Pernthaner *et al.* (1995) found no clear relation between FEC and eosinophils as indicating the development of resistance against *T. colubriformis*. On the other side, Buddle *et al.* (1992) suggested that eosinophils were associated with the development of resistance to nematodes in Romney sheep.

Mastocytosis plays an important role in the development of the resistance against GINs in which its secretion and differentiation were regulated by cytokines released by Lymphocyte CD4+. It is associated to the presence of adult worm in abomasal mucosa and is evident in case of reinfection, and more obvious in adult animals. Some authors have associated mastocytosis with larval expulsion (Salman and Duncan, 1984; Emery *et al.*, 1993; Balic *et al.*, 2000a; Vervelde *et al.*, 2001). However, in other experiments the role of mast cells in the control the infection with GINs was not clear (Huntley *et al.*, 1992). A positive correlation has been observed between mastocyte and globule leukocyte. These cells have been associated with negative correlation with EPG and worm burden (Gill, 1991; Gill *et al.*, 1993b; Amarante *et al.*, 1999, 2005). Mastocytes contain granules filled with histamine, heparin and proteases; its activation leads to secretion of cytokines as IL-4 and IL-5, and leukotrienes which causes worm rejection or death (Macaldowie *et al.*, 2003). Mucosal mast cells are thought to be changed to globules leukocyte during infection and the high numbers of leukocytes were considered as a marker of infection in adult animals (Huntley *et al.*, 1984). Leukocytes (WBCs) in resistant lambs steadily increased with infections while in susceptible lambs showed a decrease until week 5 and then steadily increased. There was no significant correlation between the decline in FEC and WBCs (Pernthaner *et al.*, 1995).

Other type of cells thought to play an important role in cell mediated response is dendritic cells (DCs). DCs are the most powerful presenting cells (APC) which activate naïve T cells. They do not act as effector cells; however they are thought to have a role to direct cell to cell contact and release cytokines. DCs expressed potential receptors, bound to nematodes as Toll-like receptors (TLRs), the mannose receptors (MR) and C-

type lectins. These receptors resulted in reduced antigenic capacity and might be result in nematode death (de Veer *et al.*, 2007).

2.4.2.B. Humoral response against infection

The parasite induces liberation of cytokines associated with Th2 response (IL-4, IL-5, IL-10, IL-12). The induced interleukins stimulates B cells to produce antibodies IgG, IgE and IgA which bind to antigen, and form an antigen-antibody complex. This complex is recognized by mastocytes, eosinophils and neutrophils. These cells lead to induction of the inflammatory process, increase of mucus secretion and stimulate the contraction of smooth muscles which causes the expulsion of parasite or death (Wood and Seow, 1996; London *et al.*, 1998; Klion and Nutman, 2004; Amarante *et al.*, 2005).

The immune response against GINs involves production of parasite-specific serum IgA, IgG, IgM and IgE (Gill *et al.*, 1993a; Pfeffer *et al.*, 1996; Kooyman *et al.*, 1997; Gómez-Muñoz *et al.*, 1998, 1999; Gill *et al.*, 2000; Huntley *et al.*, 2001; Strain and Stear, 2001; Harrison *et al.*, 2003). In addition an increase of immunoglobulin containing cells (ICC) (i.e. IgG1, IgG2, IgM and IgA) was found in abomasal mucosa of sheep after infection with *H. contortus* seven days PI; the number of immunoglobulin containing cells was six times significantly higher than in non infected ones and the peak was reached between 21-28 days after infection (Miller, 1987; Gill *et al.*, 1992). *H. contortus* infection either under natural or experimental infection especially after challenge infection induced the production of immunoglobulin and the serum antibody response was dose dependent irrespective of the infection schedule; so it was not thought to be the a typical secondary response (Cuquerella *et al.*, 1991, 1994; Schallig *et al.*, 1994, 1995).

The serum IgG has been the most measured antibody in serum in infection with GINs especially *H. contortus*. It has been recorded to be associated with reduction of helminthes size and parasite fecundity by interfering with feed intake and the metabolism of the parasite by neutralizing or inactivating vital metabolic enzymes of *H. contortus* (Gill *et al.*, 1993a; Stear *et al.*, 1999; Schallig, 2000). IgG response was higher after challenge infection than in the primary infection with *H. contortus*. IgG₁ was more related to the infection and showed a value two times higher in challenged animals as compared to the primarily infected. IgG₂ also behaved as IgG₁ but the

response was less dominant (Schallig *et al.*, 1995; Gómez-Muñoz *et al.*, 1998). McClure *et al.* (1992) thought that the rejection *T. colubriformis* in the infected lambs was associated with the appearance of globule leucocytes and increased concentration IgG antibodies in intestinal mucus.

Schallig *et al.* (1995) found that IgA did not differ between primary and challenge infection with *H. contortus* but was significantly more elevated than in the control group and mainly elevated against larval antigen. But in case of Gómez-Muñoz *et al.* (1998) it was detected an elevated level of serum IgA after challenge infection in Manchego animals whereas in Merino sheep both primary infected and challenge groups showed high levels of serum IgA. This antibody might play an important mechanism in controlling the worm length and fecundity against infection with *Tel. circumcincta*.

IgA has been considered to provoke eosinophil degranulation (Abu-Ghazaleh *et al.*, 1989) and/or forming IgA/Ag complex which induced the inflammatory cell in the mucosa to release cytokines and other inflammatory cells (Dubucquoi *et al.*, 1994). IgA is the dominant type of immunoglobulin in mucosa and represents 68-84% of total immunoglobulin containing cells followed by IgG1 and then IgM in the case of haemonchosis (Gill *et al.*, 1992; Schallig, 2000). An inverse relationship between FECs and levels of IgA anti-L3 and IgA anti-L5 in the mucosa of three breed of sheep (Santa Ines, Suffolk and Île de France) has been found (Amarante *et al.*, 2005).

The serum IgE has been reported to increase after GINs infection (Huntley *et al.*, 1998; McClure *et al.*, 2000; Pernthaner *et al.*, 2005). IgE is produced in lymphoid tissue adjacent to mucosal surfaces and binds to mast cells and globule leucocytes in the associated mucosa and connective tissue. Antigen bound to IgE on a sensitized mast cell induces the production and release of numerous vasoactive inflammatory mediators including histamine, a variety of trypsin-like proteases, arachidonic acid derivatives (prostaglandins, prostacyclins, thromboxanes and leukotrienes), chemotactic factors which attracts eosinophils and neutrophils and a range of cytokines including IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 and TNF- α (Tizard, 1992).

The attraction of these agents causes local smooth muscle contraction, increased vascular permeability which might play an important role in worm expulsion by

increased fluid flow into the gut lumen, increased mucus production and increased peristalsis which is known as rapid expulsion mechanism (Rothwell, 1989; Balic *et al.*, 2000a). An increase in total IgE levels at 2-4 weeks PI has been observed in sheep infected with *H. contortus*; these antibodies showed a negative correlation with the worm burdens (Kooyman *et al.*, 1997; Amarante *et al.*, 2005).

Some studies have determined the IgM levels in the serum after infection with *Haemonchus*. The primarily infected and challenged infected animals were associated with moderate elevated serum IgM against both larval and adult antigens (Schallig *et al.*, 1995) and also showed elevated levels in Churra sheep breed during the infection with the parasite independently of the infective schedule (Gómez-Muñoz *et al.*, 1998). Elevated serum levels of specific IgM antibodies to *T. colubriformis* have been demonstrated in infected lambs (Douch *et al.*, 1994).

2.5. Vaccination against helminths

Only a few vaccines against parasites are commercially available and nearly all are dependent on attenuated organisms. One of the examples is the early utilization, and still in use, of gamma-irradiated L3 of *Dictyocaulus viviparus* (Dictol), developed and successfully produced to immunize against cattle lung worm infection. However this vaccine has several disadvantages such as a short shelf-life and the vaccine has to be produced annually necessitating the use of donor calves. Following vaccination, calves must receive further boosting from natural challenge to maintain protective immunity (Poynter, 1963; Peacock and Poynter, 1980; Bain and Urquhart, 1988; Matthews *et al.*, 2001; Ploeger, 2002).

Among the vaccines against Digenea, the glutathione S-transferases (GST) of *Fasciola hepatica* were employed as candidate vaccine. Sheep and cattle immunized with native GSTs isolated from *F. hepatica* developed a degree of protection about 49% and 29% respectively, against the trematode infection. The result was depended on the type of adjuvant used (Creaney *et al.*, 1995). This vaccine is considered as a hidden antigen due to the presence of the enzyme (GST) on the surface of the intestinal cells of *F. hepatica* and the fact that the antigen is not recognized serologically by sheep and cattle infected with the parasite.

Vaccination of cattle with cathepsin L1 and L2 protease secreted by the same species has shown 42-69% of reduction in fluke burden and about 60% reduction in FEC (McGonigle and Dalton, 1995). The degree of protection increased to 73% when these proteins were combined with haem protein (Dalton *et al.*, 1996). In this case the helminths were not eliminated from vaccinated animals but showed reduction in growth and little liver damage.

Many protective antigens from activated oncospheres of the canine cestode *Taenia ovis* have been recognized, confirmed and successfully used to immunize sheep (intermediate host) (Rickard *et al.*, 1995; Harrison *et al.*, 1996). Recombinant 45W and EG 95 oncosphere proteins from *T. ovis* and *Echinococcus granulosus* induced the protection of animals by increasing the production of antibody and complement-mediated lysis of the cysts (Lightowlers *et al.*, 2000).

In the case of nematodes, many experiments have tried to identify relevant antigens and antigen presentation systems, both in laboratory models and actual hosts, from a variety of parasites and host species (i.e. *Trichinella spiralis*, *Ancylostoma caninum*, *Trichostrongylus* spp., *Ostertagia*, *Haemonchus*). For the most part, particularly in the nematode infections of ruminants, only partial protections have been achieved. In fact Smith and Zarlenga (2006) suggested that vaccination against nematodes in these species should be considered more an epidemiological tool to maintain low levels of pasture contamination than a tool to abolish the infection completely.

2.6. Vaccination against *Haemonchus contortus*

Vaccine development is the most investigated method as an alternative tool to control the infection with GINs especially *H. contortus*. Several types of proteins have been used to immunize lambs or kid goats. These proteins may be hidden antigens (concealed or covert antigens) or natural antigens (conventional antigens). The hidden antigens always come from the gut of the parasite and are not recognized serologically during the infection. The hidden antigens produce the immunity by the induction of high levels of antibodies but are not effective against non-blood feeding nematodes. The natural antigens are recognized serologically during the infection and include antigens such as excretory/secretory (ES), surface and somatic antigens (Ags) and can be

effective against both blood and non-blood feeding nematodes (Newton and Meeusen, 2003). An advantage of the so-called natural antigens is the possibility of natural revaccination of animals in the pasture. Moreover, the required efficacies from both approaches are different. Thus, it has been suggested that a natural antigen can be considered as control method when achieves only 60% efficacies in 80% of the flock. However, in hidden antigens efficacy must provide 80% efficacies in 80% of the flock (Barnes *et al.*, 1995).

2.6.1. Natural antigens

Not many attempts have been carried out to induce immune protection with natural antigens. Among them, Turnbull *et al.* (1992) systemically injected sheep with surface Ags from *H. contortus* larvae L3. Animals showed high levels of antibodies but without reduction in FEC and worm burden. Exsheathed L3 larvae antigens (HcSL3) were identified by the use of the antibody secreting cell (ASC) probes isolated from the abomasal lymph nodes of sheep immunised with *H. contortus*; the Ags have molecular weight about 70-83 KDa (Raleigh *et al.*, 1996). Immunisation with an antigen isolated from the surface of the HcSL3 induced about 45-55% reduction in worm burdens and an average reduction 64-69% in the FEC when administrated with alum hydroxide adjuvant (Jacobs *et al.*, 1999).

H. contortus 15/24 KDa excretory/secretory (E/S) antigens of L4 and adult worms were recognized by partially protected sheep after a secondary infection (Schallig *et al.*, 1994). When these antigens were used to immunize sheep 9, 6 and 3 months old they induced some degree of immune protection in sheep 9 and 6 months old but not in 3 months old. Vaccinated sheep of 9 and 6 months of age had reduced adult worm burdens of 82 and 77%, respectively, but no reduction in worm burden was found in 3-month-old lambs (34% higher than the control) and the protection was correlated with significant high level of antibodies IgG, IgA and IgE and with the presence of mast cells in the abomasa (Schallig *et al.*, 1997a; Vervelde *et al.*, 2001).

Three peptides of adult *H. contortus* obtained from adult soluble extracts of *H. contortus* with molecular weights (MW) of 65 (F4), 39 (F8) and 18.5 KDa (F14) were employed to vaccinate lambs. The three fractions have induced in 4-4.5 months old lambs a strong antibody response but without reduction in FEC and worm burdens

except the F8 which induced some degree of protection (reduction of FEC and worm burdens) although the differences were not statistically significant (Alunda *et al.*, 2003).

The p26/23 antigen from adult *H. contortus* soluble extracts was recognised by sera from partially protected lambs (Cuquerella *et al.*, 1994). This antigen has been partially purified by means of gel filtration and anion exchange chromatography showing a MW about 26 KDa and thought to be specific for diagnosis of lamb haemonchosis (Gómez-Muñoz *et al.*, 1996). A somatic fraction of low MW from adult *H. contortus* was used to vaccinate Manchego female lambs between 3.5 and 5 months of age. Immunization elicited a lengthening of prepatent period as compared to control group, over 60% reduction in FEC and 61.6% in worm burdens which correlated with the induction of high level of antibodies (Domínguez-Toraño *et al.*, 2000).

2.6.2. Hidden antigens

H11 is a 110 KDa gut membrane glycoprotein with microsomal aminopeptidase-like activity, purified from the adult worms (Graham *et al.*, 1994). Dorset Horn lambs 7 weeks old were vaccinated with glycosylated integral membrane protein (CABP) particularly enriched in the protein H11 and much smaller amounts of the other microvillar integral membrane proteins which bind to concanavalin A (ConA). The immunized lambs showed a 78% reduction in FEC and 83% reduction in worm burdens (Tavernor *et al.*, 1992b). The native protein induced high level of antibodies, more than 90% reduction in FECs and > 70% reduction in worm burden (Smith *et al.*, 1993).

Pregnant ewes were immunized during the last trimester with a fraction highly enriched in the membrane glycoprotein H11. The immunized ewes were then challenged with 10000 infective *H. contortus* L3 and about 98-99% reduction in FEC was observed. Furthermore, the born lambs and reared on vaccinated ewes had some levels of anti-H11 antibodies and developed partial protection at 5 weeks age to challenge infection with 3000 or 10000 *H. contortus* L3 (Andrews *et al.*, 1995).

Andrews *et al.* (1997) concluded that the vaccination with nematode gut membrane antigen H11 induces high levels of antibodies with a peak at about 60 days and persisted for long time. Vaccination of lambs was carried out by vaccinating with H11 and the challenge was administered 14, 84, 126 or 168 days later. Immunization

was associated with reduction in FEC 97%, 99%, 92%, and 86% respectively and in worm burden 87%, 94%, 92%, and 62% respectively, with high level of antibodies which were maintained elevated during the experimental period.

Galactase containing glycoprotein complex (H-gal-GP) is localized at the luminal surface of *H. contortus* gut, formed from 4 bands of 230, 170, 45 and 35 KDa under non reducing conditions. The protein consists from at least 2 types of proteolytic enzymes, a pepsin like aspartyl proteinase associated with the 45 KDa zone (Longbottom *et al.*, 1997) and a family of at least 4 putative metallo-endopeptidases associated with both the 230 and 170 KDa bands (Redmond *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1999), and a putative cysteine proteinase at 35 KDa region (Smith *et al.*, 1999). H-gal-GP isolated by N-acetyl galactosamine specific lectin affinity chromatography produced a significant degree of protection in immunized lambs with 72% reduction in worm burdens and 93% reduction in FEC (Smith *et al.*, 1994).

Merino sheep vaccinated with gut membrane proteins prepared from adult *H. contortus* (native H1lin combination with native H-gal-GP) have shown a significant reduction in anaemia and WBCs, high levels of IgG₁ and IgG₂ antibodies in plasma, reduction in worm egg counts and decrease pasture contamination when grazed with vaccinated sheep (LeJambre *et al.*, 2008).

Two distinct protease fractions from *H. contortus* have been evaluated as vaccines. The first contained a fibrinogen – degrading complex, consisting of 35 and 55 KDa proteins homologous to cathepsin B. When these proteins were used to immunize the sheep showed 87% reduction in worm burdens and 93% reduction in FEC (Cox *et al.*, 1990). The second cysteine protease fraction was comprised of three 70 KDa cathepsin B like proteases. Vaccinated sheep with a cathepsin B cysteine protease enriched fraction of *H. contortus* membranes (purified using thiol sepharose affinity chromatography) have shown 47% reduction in worm burdens and 77% reduction in FEC (Knox *et al.*, 1999).

Three microvillar ConA-binding peptides p45, p49 and p53 (complexed as p150) showed similarity to HcGA1 polyproteins (apical gut membrane proteins encoded as a polyprotein) (Smith *et al.*, 1993). These proteins induced partial protection in lambs against *H. contortus* infection with a 38% reduction of female worms, 20% reduction in

male worms (about 30% reduction in worm burdens) and 69% reduction in FEC (Knox and Smith, 2001).

Jasmer and McGuire (1991) immunized three groups of goats ranging from < 6 months to > 1 year with gut antigens which were associated predominantly with the microvillous membrane region of the parasite gut and later challenged them with 10000 L3. The immunized goats showed reduction in worm burdens ranging from 65% (kids) to 89% (yearlings) and reduction in FEC ranging from 87% in kids to 95% in yearlings. More recently, 7 months old female lambs immunized with whole gut homogenate (WGH) of *H. contortus* displayed a 77% reduction in FEC, 78% reduction in worm burdens besides high level of antibodies (Nayebzadeh *et al.*, 2008).

2.6.3. Recombinant antigens

Many attempts have been made to produce recombinant antigens by the use of molecular biology (DNA recombinant technology). One of the recombinant antigens which achieved success was the gut associated antigen (Bm 86) of *Boophilus microplus*, a membrane bound glycoprotein with molecular weight of 89 KDa and present in adult female ticks of this species (Willadsen *et al.*, 1988). *E. coli*-expressed Bm 86 vaccines (TickGard) induced antibodies that bind to Bm 86 molecule on intestinal cells. The vaccine impaired the reproductive capacity of females but have no obvious effect on the number of the ticks (García-García *et al.*, 2000). Willadsen *et al.* (1995) showed a 20-30% reduction in the number of feeding ticks, 30% reduction in weight of engorged ticks and a 60-80% in the weight of eggs laid per gram of engorged female ticks. This success with Bm 86, marketed in some countries, provided the framework to use the same approach in GIN of ruminants, among other helminths, particularly with cloned hidden antigens of *H. contortus*. Unfortunately, the results fell behind expectations.

The immunization of lambs of 6-8 months old age with a 35 KDa β -galactoside-binding lectin-like protein which is considered as a part of H-gal-GP complex did not induce any detectable antibody response, nor significantly reduced FEC and worm burdens (Newlands *et al.*, 1999).

Cloning of H11 revealed to have a microsomal amino-peptidase (AP) which was thought to play a role in the breakdown of small peptides produced by digestion of

dietary protein. Three isoforms of H11 (the H11s versions H11-1, H11-2 and H11-3) have been expressed in insect cells using recombinant baculovirus. The H11 elicited high level of antibodies but without significant reduction in FEC, about 30-40% (Smith *et al.*, 1997). Five months old worm free Suffolk Greyface crossed lambs were immunized with a cocktail of recombinant GST-hmcp1, 4 and 6 fusion proteins (3 cathepsin B-like cysteine proteinase present in thiol-Sepharose binding protein fraction (TSBP) (hmcp1, 4 and 6) identified by screening of cDNA library. These fractions have not induced any reduction in FEC although provoked a significant reduction in worm burdens at necropsy (38%) and with seven fold higher IgG titres as compared with the control group (Redmond and Knox, 2004). Recombinant Hco-GAL-2 [35 KDa β -galactoside-binding, lectin-like protein (galectin)] is part of H-gal-GP complex but this fraction failed to confer any protection in vaccinated sheep (Newlands *et al.*, 1999). In fact, it is considered that H-gal-GP is very complex and formed from several proteins and until now it is not known the active form to produce the immunity against haemonchosis. Many trials have been done to clone different parts of this protein and they have been used in experimental infections but without any significant protection (Newton and Meeusen, 2003).

Recently, Cachat *et al.* (2010) found high level of serum antibodies with both native (native H-gal-GP) and recombinant antigens (a cocktail of recombinant expressed proteins) (Hc metalloendopeptidases MEP1, MEP3 and MEP4 as soluble proteins in insect cells and recombinant Hc PEP1 expressed in *E. coli*) but the protective immunity was only observed with the native one.

The attempts to clone and express natural antigens have been very scarce. The putative cDNA encoding ES15 and ES24 have been cloned and the sequences were shown to have homology with domains of the clone encoding ES antigens in *T. colubriformis* and *Ancylostoma caninum*, respectively (Vervelde *et al.*, 2001). Vaccination with recombinant 15/24 KDa excretory/secretory proteins of *H. contortus* induced some degree of protection in 9 months old sheep (49% reduction in FEC and 55% reduction in worm burdens) but no reduction was detected in 3 months old animals. No significant increase in the level of immunoglobulins, mast cells and eosinophils was observed, this pointing to the independence between these responses and the partial protection elicited (Vervelde *et al.*, 2002). Similarly, a recombinant form

of p26/23 has been employed to vaccinate 3 months old Manchego female lambs. Immunization elicited a strong specific antibody response until the end of experiment but without reduction in FEC and worm burdens when compared to control animals (García-Coiradas *et al.*, 2010).

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. Materials

3.1.1. Parasite

The *Haemonchus contortus* strain used, originally supplied by Merck, Sharp and Dohme (Madrid, Spain), has been maintained for the last 20 years in the Department of Animal Health (UCM), Madrid, by serial passage in lambs. The third stage larvae (L3) were obtained by fecal culture at 26 °C, baermanization of the feces and partial purification on filter paper (MAFF, 1971). Adult *H. contortus* were obtained from the abomasums of lambs infected with a pure isolate of the parasite.

3.1.2. Animals

3.1.2.A. Lambs

Female Assaf lambs were obtained from a local producer (Finca la Mora, Pozuelo del Rey, Madrid, Spain) and used to maintain the *H. contortus* strain (3 animals, 3-months old) or for vaccination trials (48 animals, 4-5 months old). Coproscopical analyses, carried out immediately after their arrival, showed a slight coccidial infection and all animals were treated with Borgal® 24% Sulfadoxina-Trimetoprim (Virbac, Spain) (5 mL/ animals via intramuscular (IM) or subcutaneous (SC), 2 doses with 48 h interval). Lambs were reared indoors under *H. contortus* free conditions, fed with commercial pelleted food (Rubio Sanidad y Alimentación Animal, Madrid, Spain), hay and tap water *ad libitum*. The animals were kept in the Department of Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine (UCM) until slaughter.

3.1.2.B. Rabbits

One 2-months-old New Zealand X California Giant rabbit was employed to obtain hyperimmune sera against the recombinant antigen Hc23. Coprological analyses were conducted, which were negative to any gastrointestinal parasite. The animal was housed on site in the Department of Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine (UCM) and fed with commercial pelleted feed (Global Diet 2030, Harlan Interfauna Ibérica, Spain) and water *ad libitum*.

3.1.3. Culture media and reagents

3.1.3.A. Bacterial strains

- *Escherichia coli* strain XL-1 Blue MRF '(Stratagene) genotype: "Δ (McRae) 183Δ (mcrCB-hsd SMR-mrr) 173 endA1 sup E44 thi-1 gyrA96 relA1 lac [F ProAB lacIq ZΔM15 Tn (Tet)]; this bacterial strain was used in the preparation of the cDNA library of *H. contortus*.
- *Escherichia coli* strain XL-2 Blue MRF '(Stratagene) genotype: McRae-183, (mcrCB-mrr, hsd SMR-) 173, end A1, sup E44, thi -1, rec A1, gyr A96, rel A1, lac (F 'pro AB, lacIq Z) M15, Tn 10, Amyr, CAMR; used for transformation of plasmids pGEM-T easy cloning vector and pET-29 b (+) expression vector.
- *Escherichia coli* strain BL21 (DE3) (Novagen): recA-lac permease (lacY1), trxB, gor, F-ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm for expression and purification of proteins.

3.1.3.B. Bacterial culture media and buffers

- Carbonate buffer 0.05 M, pH 9.6: 5.3 g, Na₂CO₃ and 4.2 g, NaHCO₃.
- LB liquid media: 1% tryptone, 0.5% yeast extract and 1% NaCl.
- LB agar media: LB liquid media and 2% agar.
- NZY liquid media: NaCl 0.5%, 0.2% MgSO₄·7 H₂O, 0.5% yeast extract and 1% NZY amine.
- NZY agar media: NZY liquid media and 2% agar.
- NZY top agar media: NZY liquid media with 0.7% agarose.
- PBS buffer 1X, pH 7.4: 8 g (137 mM) NaCl, 0.2 g (2.7 mM) KCl, 1.15 g (10 mM) Na₂HPO₄ and 0.2 g (2 mM) KH₂PO₄.
- PBS-T buffer 1X, pH 7.4: PBS buffer and 0.05% Tween-20.
- SM buffer: 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM MgSO₄·7H₂O and 0.002% gelatin (2%).
- SOC media: 2% tryptone, 0.5% yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂·6H₂O, 10 mM MgSO₄·7 H₂O and 20 mM glucose.
- SSC 20X buffer: 3 M NaCl and 300 mM Sodium Citrate.

- TAE buffer 50X: 242 g Tris Base (MW=121.1), 57.1 mL Glacial Acetic Acid and 10 mL [0.5 M] EDTA.
- TBS buffer 1X, pH 7.4: 10 mM Tris-HCl and 0.15 mM NaCl.
- TBS-T buffer 1X, pH 7.4: TBS buffer and 0.05% Tween-20.

All media were autoclaved. Heat sensitive components such as antibiotics and glucose were sterilized by filtration (0.22 μ m) and added to the culture medium previously autoclaved and cooled to 50 °C.

3.1.3.C. Antibiotics

- Ampicillin (Roche): was added to the medium at a concentration of 100 μ g/mL.
- Chloramphenicol (Sigma-Aldrich): was added to the medium at a concentration of 30 μ g/mL.
- Kanamycin solution (Sigma-Aldrich): was added to the medium at a concentration of 25 μ g/mL.

3.1.3.D. Vectors

- pGEM-T Easy Vector System, T-Overhangs for Easy PCR Cloning (Promega).
- pET-29 b (+) Expression vector (Novagen).
- Uni-ZAP® XR Vector System (Stratagene).

3.1.3.E. Molecular weight markers (DNA, proteins) and kits

- Absolutely mRNA purification kit (Stratagene).
- Amersham low molecular weight calibration kit for SDS electrophoresis (GE-Healthcare).
- Illustra RNAspin mini isolation kit (GE-Healthcare).
- Lambda ZAP cDNA library kit (Stratagene).
- Maxwell™16 total RNA purification kit (Promega).
- Molecular weight marker DNA II (Roche).
- Molecular weight marker DNA XIV (100 bp ladder) (Roche).
- Precision plus protein TM standards (all blue) or (dual color) (Bio-Rad).
- Prestained SDS-PAGE standards broad range (Bio-Rad).

- QIAprep spin miniprep kit (250) (QIAGEN).
- QIAquick gel extraction kit (250) (QIAGEN).

3.1.3.F. Other reagents

- 25 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ Stock solution (Roche).
- 2-propanol (Panreac Química S.A.U).
- 4-chloro-1-naphthol (0.5 $\mu\text{g/mL}$) (Sigma-Aldrich).
- AbSolve™-solution (Perkin Elmer).
- Accustain® eosin solution (Sigma-Aldrich).
- Acetic acid (glacial) absolute (Panreac Química S.A.U).
- Acetone for instrumental analysis (Panreac Química S.A.U).
- Acrylamide for molecular biology $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich).
- Agar, bacteriological European type (Panreac Química S.A.U).
- Albumin from bovine serum lyophilized powder, $\geq 98\%$ (agarose gel electrophoresis, BSA) (Sigma-Aldrich).
- Aluminium hydroxide gel colloidal suspension $\text{Al}(\text{OH})_3$ (Sigma-Aldrich).
- Ammonium bicarbonate (Panreac Química S.A.U).
- Anti-digoxigenin-AP, fab fragments (Roche).
- Bio-Rad protein assay (Bio-Rad).
- Blocking reagent for nucleic acid hybridization and detection (Roche).
- Borgal® 24% (sulfadoxina- trimetoprim) (Virbac-España).
- Bromophenol blue sodium salt (Sigma-Aldrich).
- Calcium chloride, minimum 96% poder, anhydrous (CaCl_2) (Sigma-Aldrich).
- Chloroform 99+% for molecular biology (Sigma-Aldrich).
- Complete Freund's adjuvant (CFA) (Sigma-Aldrich).
- Complete mini EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets (Roche).
- Coomassie® brilliant blue R-250 (Sigma-Aldrich).
- D-(+)-Glucose $\geq 99.5\%$ (GC) (Sigma-Aldrich).
- Di-potassium hydrogen phosphate anhydrous (K_2HPO_4) (Panreac Química S.A.U).
- Di-Sodium hydrogen phosphate anhydrous (Na_2HPO_4) (Panreac Química S.A.U).

- Diethyl pyrocarbonate (DEPC) (Sigma-Aldrich).
- DIG-DNA 10X dNTP labeling mixture, 1mM dATP, 1mM dGTP, 1mM dCTP, 0.65 mM dTTP, 0.35 mM DIG- dUTP, alkali-labile, pH 7.5 (Roche).
- Dimethyl sulfoxide reagent, $\geq 99.9\%$ (DMSO) (Sigma-Aldrich).
- EIA grade affinity purified goat anti-rabbit IgG (H+L) horseradish peroxidase conjugate (Bio-Rad).
- Ethanol, absolute (Panreac Química S.A.U).
- Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt 2-hydrate (EDTA) (Panreac Química S.A.U).
- EZMix™ N-Z-Amine® A (Sigma-Aldrich).
- Formaldehyde 35-40% p/v (Panreac Química S.A.U).
- Gelatin from porcine skin (gel strength 300, Type A) (Sigma-Aldrich).
- Glycerol (Panreac Química S.A.U).
- Horseradish peroxidase-labelled donkey anti-sheep IgG (Sigma-Aldrich).
- Hydrochloric acid 37% (HCl) (Panreac Química S.A.U).
- Hydrogen peroxide 33% w/v (H₂O₂) (Sigma-Aldrich).
- Imidazol (Panreac Química S.A.U).
- Immobilon P (Millipore, Bedford, MA, USA).
- Incomplete Freund's adjuvant (IFA) (Sigma-Aldrich).
- Intervac (Inactivated cells of *Propionibacterium acnes* 0.25 mg plus lipopolysaccharide of *E. coli* cells 0.02 mg) (Calier, Spain).
- Isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) (Roche).
- Magnesium chloride 6-hydrate (MgCl₂.6H₂O) (Panreac Química S.A.U).
- Magnesium sulphate 7-hydrate (MgSO₄.7 H₂O) (Panreac Química S.A.U).
- Maleic acid reagent plus® $\geq 99\%$, (Sigma-Aldrich).
- Maltose 1-hydrate (Panreac Química S.A.U).
- Methanol absolute (Panreac Química S.A.U).
- Monoclonal anti-goat/sheep IgG-alkaline phosphatase antibody produced in mouse (Sigma-Aldrich).
- N, N', N'-tetramethylethylenediamine (TEMED) (Merck Chemicals).
- N, N'-Methylene diacrylamide for electrophoresis (Merck Chemicals).
- NBT/BCIP stock solution (Roche).

- NHs activated sepharose HP column, 5 mL (GE-Healthcare).
- Nickel-nitrilotriacetic acid agarose (Ni-NTA) (for purification of 6X-His-tagged proteins by gravity-flow chromatography) (QIAGEN).
- N-Lauroylsarcosine sodium salt $\geq 94\%$ (Sigma-Aldrich).
- Nylon membranes for colony and plaque hybridization (Roche)
- PCR nucleotide mix plus 10 mM (Roche).
- Phenol crystallized (Panreac Química S.A.U).
- P-nitrophenil phosphate disodium salt hexahydrate (Sigma-Aldrich)
- Ponceau S (Sigma-Aldrich).
- Potassium chloride (KCl) (Panreac Química S.A.U).
- Potassium di-hydrogen phosphate anhydrous (KH_2PO_4) (Panreac Química S.A.U).
- Powdered skimmed milk (blocking solution) (Molico, Nestlé).
- Protein A agarose (Roche).
- RNA later (QIAGEN).
- SeaKem® LE agarose (Lonza).
- S-hexyl glutathione-agarose (Sigma-Aldrich).
- SnakeSkin® pleated dialysis tubing, 3.500 MWCO, 22 mm dry diameter (ID) X 35 ft (Thermo-Scientific).
- Sodium acetate [NaOAc] (Panreac Química S.A.U).
- Sodium bicarbonate (NaHCO_3) (Sigma-Aldrich).
- Sodium carbonate anhydrous (Na_2CO_3) (Panreac Química S.A.U).
- Sodium chloride (NaCl) (Panreac Química S.A.U).
- Sodium citrate tribasic dihydrate (Panreac Química S.A.U).
- Sodium di-hydrogen phosphate anhydrous (NaH_2PO_4) (Panreac Química S.A.U).
- Sodium dodecyl sulphate (SDS) (Panreac Química S.A.U).
- SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen).
- Taq DNA polymerase (Invitrogen).
- Taq DNA polymerase PCR buffer 10X: 200 mM Tris-HCl (pH 8.4) and 500 mM KCl (Invitrogen).
- Tri-Reagent (Sigma-Aldrich).

- Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Panreac Química S.A.U).
- Triton X100 (Panreac Química S.A.U).
- Tryptone (Panreac Química S.A.U).
- Tween-20 (Panreac Química S.A.U).
- Valbazen ® 10% Albendazol (Pfizer).
- Yeast extract (Panreac Química S.A.U).
- β -mercaptoetanol (β ME) (Merck Chemicals).

3.1.4. Equipments

- AccuBlock™ digital dry baths (Labnet International, Inc. Global).
- Centrifuge Orto Alresa Digicen 20 (Orto Alresa).
- Column 10 X 1 cm for chromatography (GE-Healthcare).
- Digital horizontal shaker (Ovan).
- Electronic pipette Proline single and multichannels (Biohit).
- Electrophoresis power supply (Consort-EV265).
- Haematocrit centrifuge (Orto Alresa).
- Horizontal electrophoresis chamber model SHU13 (Bio-Rad).
- Incubators (J.P Selecta).
- LyoBeta lyophilizer (Telstar-S.A.).
- Mid bench Sigma 3K30 centrifuge (High speed refrigerated table top centrifuge) (DJB-Labcare).
- Mini trans-blot transfer cell (Bio-Rad).
- NanoDrop® ND-1000 spectrophotometer (Thermo-Scientific).
- Nunc maxisorp® flat-bottom 96 well plate (Thermo-Scientific).
- Opsys MR microplate reader (Dynex Technologies, USA).
- Optical microscope model alphaphot-2 (Nikon).
- Peristaltic pump p-1 (GE-Healthcare).
- ProBlot™ 12 hybridization oven (Labnet International, Inc. Global).
- PTC-100® thermal cycler (MJ Research, Inc.).
- Safe Imager™ blue light transilluminator (Invitrogen).
- SE 250 mini vertical electrophoresis units (Hoefer).

- Maxwell™16 system (Promega).
- TissueRuptor (QIAGEN).
- Transilluminator UV/white light AC input 220, V50 Hz, model TFP-M/WL (Bio-Gen).
- Tru-Test™ EziWeigh 2 scale system.
- Ultrasonic homogenizers (Bandelin, Sonopuls).
- Vertical laminar flow cabinets, V-30/70 (Telstar-S.A.).
- Vibromix 31 shaker (Technica®).
- Vortex-Genie® mixers (Scientific Industries).

3.2. Methods

3.2.1. Isolation of total RNA of *H. contortus*

We have used three methods for the isolation of total RNA of *H. contortus* to determine the amount of total RNA, the degree of purity and integrity.

3.2.1.A. Isolation with the illustra RNAspin mini isolation kit

The RNAspin mini RNA isolation kit was used to purify total RNA according to the manufacturer's instructions (https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GE/LS/Related%20Content/Files/1314774443672/litdoc28407085AAmini_20110831103255.pdf). The nematodes (30 mg of adult helminthes of the both sexes with and without RNA later) were homogenized using TissueRuptor (QIAGEN) with buffer RA1. The lysates were prefiltered using column filters included in the kit and without digestion with DNase I and the yielded RNA was eluted in 50 µL nuclease-free water.

3.2.1.B. Isolation using the maxwell total RNA purification kit

The maxwell 16 instrument was used to purify total RNA in which 100 mg of adult helminthes of both sexes of *H. contortus* were used. The nematodes (with and without RNA later) were homogenized using TissueRuptor (QIAGEN) and then followed the manufacturer's instructions (<http://www.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20bulletins/101/maxwell%2016%20tissue%20lev%20total%20rna%20purification%20kit.pdf?la=en>). Briefly, samples were pre-processed to give a cleared lysate. The first step involved RNA lysis buffer that contains guanidine thiocyanate (GTC) to lyse the sample. RNA dilution buffer was added to samples to precipitate sample debris, and a novel clearing agent was added to remove contaminating DNA. After briefly heating at 65 °C, the sample was cleared by centrifugation through provided spin columns. The cleared lysates were added directly to wells of the prefilled reagent cartridge.

The functionality of the maxwell 16 total RNA purification kit is based on the sequential capture and release of paramagnetic particles into the wells of the total RNA purification cartridge. RNA was efficiently captured using MagneSil® paramagnetic particles (PMPs), and sequential washing in alcohol-containing wash

buffers effectively removed impurities. Purified total RNA was eluted from the PMPs into nuclease-free water.

3.2.1.C. Tri-Reagent Method

Adult helminths (50-100 mg of adult worms from both sexes) were employed with a modification of the single-step method of RNA isolation by acid guanidinium (Chomczynski and Sacchi, 1987) and according to manufacturer's instructions (<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Bulletin/t3809bul.Par.0001.File.tmp/t3809bul.pdf>). The nematodes were homogenized using TissueRuptor (QIAGEN) in 1 mL of Tri-Reagent and incubated at room temperature (RT) for 5 min. Chloroform (0.2 mL of chloroform per mL of Tri-Reagent used) was added. The sample was tightly covered, shaken vigorously for 15 seconds, and allowed to stand for 15 min at RT. Centrifugation (12000 $\times g$ for 15 min at 4 °C) separated the mixture into 3 phases: a red organic phase (containing protein), an interphase (containing DNA), and a colorless upper aqueous phase (containing RNA).

The aqueous phase was transferred to a fresh tube and 0.5 mL of 2-propanol per mL of Tri-Reagent used in sample preparation were added. The sample was allowed to stand for 2 h at -20 °C and centrifuged at 12000 $\times g$ for 10 min at 4 °C. The RNA precipitate formed a pellet on the side and bottom of the tube. The supernatant was removed and the RNA pellet was washed by adding a minimum of 1 mL of 75% ethanol per 1 mL of Tri-Reagent used in sample preparation; vortexed and centrifuged at 12000 $\times g$ for 5 min at 4 °C. RNA pellet was air-dried for 5–10 min and an appropriate volume of DEPC-treated water was added.

3.2.2. Quality Assessment

RNA samples were quantified, and their purity assessed, with NanoDrop® ND-1000 spectrophotometer. The integrity of the total RNA sample was assessed by electrophoresis on a 1% non-denaturing agarose gel run in RNase-free 1X TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA pH 8.0). RNA was loaded in RNA loading buffer 5X after it had been incubated at 65 °C for 15 min, briefly spun down, and placed on ice. All gel casting and running apparatus were treated for RNase-contamination by soaking it in a 2% v/v AbSolve™ solution for 1 h and rinsing it with DEPC-treated

water (Sambrook *et al.*, 1989).

3.2.3. Purification of mRNA

Total RNA of *H. contortus* was used for isolation of messenger RNA (mRNA) with mRNA purification kit (Stratagene) (<http://www.chem-agilent.com/pdf/strata/400800.pdf>). The purified mRNA was eluted in the elution buffer and transferred to a fresh RNase free tube, quantified and stored in - 20 °C until use for cDNA synthesis.

3.2.4. Construction of cDNA library of *H. contortus*

H. contortus cDNA library was constructed using lambda ZAP cDNA library kit (Stratagene) according to the manufacturer's instructions (<http://www.genomics.agilent.com/files/Manual/200448.pdf>) (Figure 3.1).

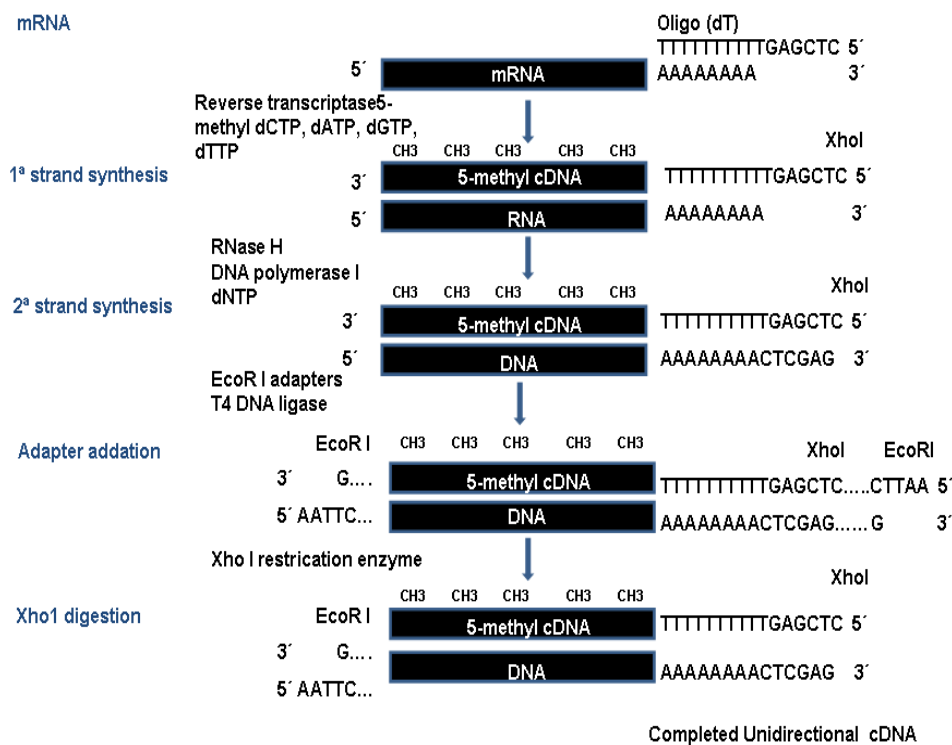


Figure 3.1. cDNA synthesis flow chart.

3.2.4.A. First-strand cDNA synthesis

H. contortus poly (A) + RNA (3 µg) was used as starting material to synthesize first strand cDNA. Briefly, the first strand was synthesized in a total volume of 50 µL reaction [5 µL of 10X first-strand buffer, 3 µL of first-strand methyl nucleotide mixture, 2 µL of linker–primer (1.4 µg/µL), 17.5 µL of DEPC-treated water, 1 µL of RNase block ribonuclease inhibitor (40 U/µL) and 20 µL of poly (A)+ RNA]. Finally, 1.5 µL of StrataScript reverse transcriptase (50 U/µL) was added to the reaction, followed by incubation at 42 °C for 1 h and immediately cooled on ice.

3.2.4.B. Second-strand cDNA synthesis

For the second strand synthesis, 45 µL of the synthesized first strand cDNA was used as template. The second strand was performed in a 200 µL mixture, composed by 10X second-strand buffer, second-strand dNTP mixture, RNase H (1.5 U/µL), DNA polymerase I (9.0 U/µL) and DEPC-treated water in 16 °C for 2.5 h.

3.2.4.C. Blunted cDNA termini

The double stranded cDNA was treated with the blunting dNTP mix and cloned Pfu DNA polymerase (2.5 U/µL) by incubating at 72 °C for 30 min, purified by phenol/chloroform extraction [1:1 (v/v)] and followed by precipitation with 3 M sodium acetate and 100% ethanol overnight at –20 °C. The pellet was collected by centrifugation at 14000 rpm for 60 min at 4 °C.

3.2.4.D. Ligation and phosphorylation of EcoR I ends

The resuspended double stranded cDNA was ligated to the EcoR I adapters using T4 DNA ligase (4 U/µL) at 4 °C for 2 days. The adapter ends were phosphorylated by incubating for 30 min at 37 °C with T4 polynucleotide kinase (5 U/µL).

3.2.4.E. Digestion with Xho I

The cDNA was digested with Xho I (40 U/µL) at 37 °C for 1.5 h and followed by precipitation overnight at –20 °C with 10X STE buffer (Sodium–Chloride-Tris-EDTA buffer) and 100% (v/v) ethanol and subjected to centrifugation at maximum

speed for 60 min at 4 °C.

3.2.4.F. Size fractionation

cDNA produced was resuspended in 10 µL of sterile water. A 0.8% agarose gel stained with 1X ethidium bromide was prepared. cDNA was loaded into the gel along with a DNA ladder. The two gel pieces were then placed side-by-side on a UV-transilluminator with the indicator lane and ladder exposed to the light source, and the DNA piece shielded. Three size fractions with ranges of 0.5 Kb - 2 Kb (Fraction 1), 2 Kb -4 Kb (Fraction 2) and > 4 Kb (Fraction 3) were excised from the cDNA piece, using the transilluminated indicator and marker lanes as guidelines (Draper *et al.*, 2002).

Each fraction was excised with a new scalpel blade, and the cDNA was recovered by means of electroelution. The 3 fractions of gels were put in a dialysis bag filled with 1X TAE buffer; the bags were subjected to electrophoresis at 4-5 v/cm overnight. TAE buffer in dialysis bag was collected and the bag was washed with 1X TAE buffer once. TAE buffer containing cDNA was collected and centrifuged under 12000 xg for 30 seconds to remove gel. The recovered cDNA was precipitated using 1/10th volume sodium acetate and 2.5 volumes of ethanol at -20 °C. After centrifugation the pellet was washed with 70% ethanol. 1µL of the resuspended cDNA was ligated with the predigested Uni-ZAP XR vector by T4 DNA ligase (4 U/µL) for 2 days at 4 °C.

3.2.4.G. Packaging protocol and titration of the library

Ligation products of cDNA and vector arms were packaged to Gigapack III Gold packaging extract to form recombinant phages. All the processes were conducted according to Sambrook *et al.* (1989) and recombinant phages were ready for titration. Streak the *E. coli* XL1-Blue in LB media containing tetracycline. The plates were incubated overnight at 37 °C. 50 mL cultures of *E. coli* XL1-Blue were prepared separately in LB broth with 10 mM MgSO₄·7 H₂O and 0.2% maltose, incubated with shaking at 37 °C for 4–6 h until they reached an OD 600 of ≤ 0.6.

The titer of the packaged ligation product was determined by mixing 1 µL of a 1:10 dilution of the final packaged reaction with 200 µL of *E. coli* XL1-Blue cells at

OD 600 \leq 0.5. The phages and the bacteria were incubated at 37 °C for 30 min to allow the phage to attach to the cells; 3 mL of NZY top agar melted and cooled to ~48 °C were added, and plated immediately into dry, prewarmed NZY agar plates. The plates were allowed to set for 10 min at RT and incubated inverted at 37 °C. Plaques were visible after 6–8 h. Plaques were counted and the titter was determined in plaque-forming units per millilitre (pfu/mL) as follows:

$$\frac{\text{Number of plaques dilution factor X total packaging volume}}{\text{Total numbers of micrograms packaged X number of microliters plated}}$$

3.2.4.H. Amplification of the library

Amplification of the library was done by using NZY agar plate with 3 mL of NZY top agar previously melted and cooled to ~48 °C. The packaged mixture 2.5×10^4 was mixed with 200 μ L of *E. coli* XL1-Blue (diluted in 10 mM MgSO₄·7H₂O until OD 600 \leq 0.5). Phage and host cells were incubated for 30 min at 37 °C to allow the phage to attach to the cells; then they were mixed with 3 mL of NZY top agar and spread evenly in the plates of NZY agar and the plate inverted was incubated at 37 °C for 6-8 h. The plates were overlaid with 4 mL of SM buffer and stored at 4 °C with gentle shaking. On second day, the bacteriophage suspension from each plate was recovered and pooled into a sterile polypropylene container and chloroform added to a 5% final concentration, mixed well and incubated for 15 min at RT. The cell debris was removed by centrifugation for 10 min at 500 \times g, the supernatant was recovered and transferred to a sterile polypropylene container. Aliquots of amplified library were stored in 7% DMSO at – 80 °C.

3.2.5. Polymerase chain reaction (PCR)

Amplifications were performed in PTC-100® thermal cycler (MJ Research, Inc.) according to the method mentioned by Sambrook *et al.* (1989). The reaction mixture for the PCR had a final volume of 30 μ L, which contained 1X PCR buffer, 1.5 mM MgCl, 200 mM of each deoxynucleotide dATP, dCTP, dGTP and dTTP (Roche), 10 pmol of each primer, 10 ng of DNA and 0.25 units of Taq polymerase (Invitrogen). PCR was performed using the plasmid (pGEM-T cloning vector) primers SP6 (5' ATT TAG GTG ACA CTA TAG AA '3) and T7 (5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG '3). PCR conditions were 94 °C/5 min, 35 cycles (94 °C/1 min, 54 °C/1 min, 72 °C/2

min) and 72 °C/10 min. The fragment obtained was evaluated by 1% agarose gel and then purified using QIAquick gel extraction kit (QIAGEN) following the manufacturer's recommendations.

The DNA from the previous reaction was subjected to another PCR reaction using gene insert primers designed by García-Coiradas *et al.* (2010), FBamHI (5' GGA TCC

'3) and RHindIII (5' AAG CTT

'3) and PCR conditions were: 94 °C/2 min, 35 cycles (94 °C/1 min, 65 °C/1 min, 72 °C/1 min) and 72 °C for 10 min. The fragment obtained was analyzed by 1% agarose gel and then purified using the QIAquick gel extraction kit (QIAGEN) following the manufacturer's recommendations and it was used for screening the *H. contortus* cDNA library.

3.2.6. Electrophoresis of nucleic acids (DNA and RNA)

Electrophoresis of nucleic acids were performed according the to instructions of Sambrook *et al.* (1989) in which 1% agarose gels in 1X TAE buffer was used and the gels were heated to the boiling point in a microwave. After that 5 µL of SYBR[®] Safe DNA gel stain (Invitrogen) was added to the prepared gel and the gel was poured on a solid support with combs to create the wells. After polymerization of the gel, the samples containing DNA were loaded in DNA loading buffer 4X (Tris-HCL 1M , 0.5 M EDTA pH 8, 30% glycerol and 0.002% bromophenol blue) or RNA loading buffer 5X (10 mg bromophenol blue, 10 mg xylene-cyanol, 200 µL EDTA 0.5 M pH 8 and 10 mL formamide). After subjecting the gels to a constant potential difference (5 v/cm) they were analyzed by exposure to Safe Imager[™] blue light transilluminator (Invitrogen).

3.2.7. DNA labelling with digoxigenin

DNA labelling with digoxigenin-dUTP was performed using the previous samples isolated from the plasmid pGEM-T vector using FBamHI and RHindIII and purified from the gel with gel extraction kit. The PCR reactions were carried out in a total volume of 50 µL, using 100 mM of dATP, dCTP, dGTP, dTTP and Dig-11-dUTP, 1X PCR buffer, 15 pmoles of each primer (FBamHI and RHindIII), 0.25 units of Taq polymerase and 10 ng of DNA. PCR cycles were the same as described in

section 3.2.5 for amplification of the respective fragment. The fragment obtained was evaluated by 1% agarose gel and then purified using QIAquick gel extraction kit (QIAGEN) following the manufacturer's recommendations.

To quantify the amplified DNA labelling with digoxigenin [DIG DNA Labelling Kit (Roche)] the manufacturer's recommendations were followed (www.roche-applied-science.com/pack-insert/11175033910a.pdf) by making serial dilutions using DNA dilution buffer of the kit for labelled control DNA, unlabelled control DNA and the amplified DNA labelled with digoxigenin (1:10, 1:100 and 1:1000). Four μ L from every dilution were placed in a positively charged nylon membrane (Roche) and then the samples were fixed by the exposure to UV light for 3 min using transilluminator UV/white light AC input 220, V50 Hz (Bio-Gen).

3.2.8. Southern-blot for the labeled DNA with digoxigenin

After fixation the nylon membranes were washed for 2 min with 20 mL of buffer 1 (Maleic acid 0.2 M and NaCl 0.15 M) and then incubated for 30 min with buffer 2 [buffer 1 with 1:10 of blocking agent (Roche)]. After that the membranes were incubated for 1 h with anti-Dig-Fab (Roche) conjugated with alkaline phosphatase in buffer 2 at a dilution of 1:5000. The membranes were washed 3 times 15 min each with buffer 1 and the membrane was equilibrated with buffer of substrate of the enzyme (Tris-HCl 0.1 M pH 8, NaCl 0.1 M and $MgCl_2$ 0.05 M) for 5 min. Finally, the membrane was incubated with chromogenic substrate solution NBT /BCIP (Roche) in buffer of substrate until the appearance of a colored precipitate to determine the optimal concentration of labeled DNA for using in screening of the cDNA *H. contortus* library (Sambrook *et al.*, 1989).

3.2.9. Screening of cDNA library

For the screening of the cDNA library the dilution 10^4 was chosen. This dilution allowed us to manage the plates overnight without confluency. A total of 6 plates were used and were incubated at 4 °C for 30 min. Nylon filters (Roche) were placed for 1 min on the plates, being careful not to leave air bubbles. The membranes were removed gently and dried on 3 mm Whatman ® filter paper. In the same way replicas were made, but these were left in contact with the agar for 10 min. Once dried

the nylon filters were soaked in each of the following solutions:

- Distortion buffer: 0.5 M NaOH and 1.5 M NaCl (5 min).
- Neutralization buffer: 1 M Tris-HCl pH 7.4 and 1.5 M NaCl (15 min).
- Balance buffer: 2X SSC (10 min).

DNA was then fixed to the nylon membrane by the exposure to UV light for 3 min using transilluminator UV/white light AC input 220 V, 50 Hz (Bio-Gen). Nylon membranes carrying the transferred DNA were pre-hybridized in pre-hybridization buffer [5X SSC, 1% blocking agent (Roche), 0.1% N-lauryl sarcosine (Sigma-Aldrich) and 0.2% SDS] for 2 hour at 68 °C with gentle agitation in a hybridization oven ProBlot™ 12 hybridization oven (Labnet International, Inc. Global). Labeled DNA from the previous step was dissolved in pre-hybridization buffer and incubated for 10 min at 95 °C for denaturation. This solution replaced the pre-hybridization buffer and the membrane was left to hybridize for 8 to 12 h at 68 °C.

Once the process of hybridization was completed, the nylon membranes were washed 2 times with high stringency solution (0.1% SDS and 2X SSC) for 5 min at RT followed by 2 washes with low stringency solution (0.1X SSC and SDS 0.1%) for 5 min at 68 °C. Between the two washing steps, it should be washed one time with double distilled water at 68 °C. All steps of the protocol were carried out at RT with gentle shaking and followed the same process as described in section 3.2.8.

The plaques that were positive for hybridization with the DNA with digoxigenin were cut from the agar and placed in 1 mL of SM buffer; phage particles resuspended in buffer and 10 µL of chloroform were added and incubated overnight at 4 °C. Positive plaques were resuspended in the buffer making the same dilution as above and repeating the same process of culture to allow the production of 60 to 100 plaques per plate. The method described above for screening of positive plaques was used and the process was done 3 times to ensure the isolation of a single phage. The positive recombinant phage stock was obtained and kept at 4 °C. The phage solution was mixed with 20% sterile glycerol and frozen at -80 °C for long-time maintenance.

3.2.10. Quality of cDNA *H. contortus* library

After growth of phages in NZY agar plates, an individual plaque was taken with a sterile pipette tip and deposited in sterile eppendorf containing 50 µL of SM

buffer; the mixture was boiled for 10 min and centrifuged at 13000 rpm for 5 min. PCR from the phage was performed using phage primers T3 (5' AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG '3) and T7 (5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG '3). PCR conditions were: 95 °C/2 min, 35 cycles (95°C/1 min, 55 °C/1 min, 72 °C/2 min) and 72 °C/7 min.

3.2.11. Determination of complete sequence of the gene encoding Hc23

Amplification of complete gene encoding Hc23 was performed using the positive plaques isolated before with southern blotting technique. The gene specific primers used were R (final sequence of the gene encoding Hc23) (5'

'3) in combination with T3 cDNA library vector primer (5' AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG '3) to amplify both full length cDNA sequences. The PCR conditions were 95 °C/2 min, 35 cycles (95 °C/1 min, 55 °C/1 min, 72 °C/ 2 min) and finally 72 °C/7 min. PCR products were cloned in pGEM-T easy vector (Promega) and sequenced. PCR products were electrophoresed in 1% agarose gel stained with SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen) and visualized with UV transilluminator (Invitrogen).

Sequence analysis allowed the translation of start and stop signals to be determined. Oligonucleotide primers, the forward primer, pET-HcF, (5' CTT ACA '3) contained the NdeI recognition site and reverse primer, pET-HcR, (5' TGA TCT

3') contained recognition site for XhoI, were designed to facilitate in-frame cloning and expression of the full-length gene encoding Hc23 amplified product. The PCR conditions were 94 °C/3 min, 35 cycles (95 °C/1 min, 68 °C/1 min, 72 °C/1 min) and 72 °C/7 min.

3.2.12. Preparation of competent cells

One single isolated colony of non-competent *E. coli* cells previously cultured on LB agar was transferred to 10 mL LB liquid medium and allowed to grow overnight at 37 °C; 5 mL were transferred into 500 mL LB media in 3 L flasks. Cells were allowed to grow at 37 °C (250 rpm, orbital shaking), until OD 600= 0.5 (~2-3 hours). Cells were cooled with ice for 10 min, passed to 50 mL falcon flasks

previously cooled and centrifuged at 4 °C, 4000 rpm/17 min. Pellet was resuspended in the same volume of cold 0.1 M MgCl₂·6H₂O and placed on ice for 15 min and then centrifuged again at 4000 rpm (7 min at 4 °C); 25 mL of 0.1 M CaCl₂ were added and the pellet was resuspended vigorously and left 1 h on ice and centrifuged at 4000 rpm 5 min/4 °C. Final pellets were resuspended in 5 mL 0.1 M CaCl₂ plus 20% glycerol and stored at -80 °C until used (Sambrook *et al.*, 1989).

3.2.13. Ligation of DNA fragments

The ligation reactions were performed in a final volume of 10 µL with 1 U of enzyme and the ligation buffer supplied by the manufacturer. We used the molar ratios of 1:1, 1:3, 1:5, 1:7, 1:10 (vector: insert) and pET-29 b (+) expression vector at a concentration of 50 ng (Table 3.1), depending on the size of the DNA insert. The ligation mixture was incubated overnight at 4 °C. To calculate the appropriate amount of PCR product (insert) to include in the ligation reaction the following equation was employed:

$$\frac{\text{ng of vector} \times \text{Kb size of insert}}{\text{Kb size of vector}} \times \text{insert: vector molar ratio} = \text{ng of insert}$$

Table 3.1. Ligation reaction of insert and pET 29 b (+) expression vector.

Reaction Component	Background	1:1	1:3	1:5	1:7	1:10
Water	7	6	6	5.5	4.9	4
Buffer 10X	1	1	1	1	1	1
Vector 50 ng	1	1	1	1	1	1
Insert	-----	1(dil. 1:3)	1	1.5	2.1	3
T4 DNA ligase	1	1	1	1	1	1
Total	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL

Ligation in pGEM-T Easy vector was performed following the manufacturer's recommendations (<http://www.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20manuals/0/pgem-t%20and%20pgemt%20easy%20vector%20systems%20protocol.pdf?la=en>) [2X ligation buffer, T4 DNA ligase, vector pGEM-T Easy at a concentration of 25 ng] overnight at 4 °C. Molar ratios used were insert: vector ratio 1:1, 3:1 and 3:1 (Table 3.2).

Table 3.2. Ligation reaction between insert and pGEM-T easy cloning vector.

Reaction Component	Background	1:1	1:3	3:1	Positive control
2X Rapid Ligation Buffer	5	5	5	5	5
pGEM-T Easy Vector (25 ng)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
PCR product	-----	1 (1/5)	1(1/10)	1	-----
Control Insert DNA	-----	-----	-----	-----	1
T4 DNA Ligase (3 Weiss units/ μ L)	1	1	1	1	1
Water	3.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Total	10 μ L	10 μ L	10 μ L	10 μ L	10 μ L

3.2.14. Transformation of competent bacterial cells

Ligation mixture (10 μ L) and 100 μ L of competent cells was incubated for 20 min on ice, applied a heat shock at 42 °C for 1 min and then cooled again on ice for 5 min. SOC medium (0.9 mL) was added and the mixture was incubated 1.5 h at 37 °C with shaking to allow recovery of bacteria. Bacterial cells were collected by centrifugation at 1000 xg for 5 min. Pellet was resuspended in 100 μ L of fresh SOC medium and plated on LB plates (with ampicillin in case of using pGEM-T Easy vector and kanamycin in case of using pET-29 b (+) as vector of expression). The plates were incubated at 37 °C for 12-16 h (Sambrook *et al.*, 1989).

3.2.15. DNA digestion with restriction endonuclease enzyme

Following the initial confirmation (by cloning in the cloning vector and sequencing), the amplicon was purified with gel extraction kit and digested with restriction endonucleases NdeI and XhoI in buffer H1 (1-2 hours) with total reaction volume ranging from 20 to 100 μ L. Double digestions were performed using the same reaction buffer for both enzymes. They were tested after the first digestion, digested with a second enzyme and run a gel using gel extraction kit (QIAGEN). The same digestion reaction was carried out on pET- 29 b (+) (Novagen).

3.2.16. PCR colony of *E. coli* cells

To confirm the efficient of cloning, the presence of insert, size and orientation in the vector, 3 separated colonies from each dilution were streaked in 3 mL of LB liquid media [LB plus ampicillin in case of cloning in pGEM-T easy vector and kanamycin in case of pET-29 b (+) expression vector] and incubated at 37 °C for 8 h. 200 μ L from each dilution was taken and centrifuged at 13000 rpm for 3 min and the pellet resuspended in 50 μ L of sterile H₂O; the cells were broken by heating at 100 °C for 5 min and were subjected to centrifugation at 13000 rpm/5 min and the supernatant was the DNA used for the PCR reaction (Sambrook *et al.*, 1989).

3.2.17. Minipreps

To confirm the presence of the recombinant plasmid in the transformed cells, the plasmid was extracted from the cells by plasmid miniprep extraction kit (QIAprep Spin Miniprep Kit 250) (QIAGEN) and analyzed by PCR. The PCR product was sequenced and the sequence compared with its Gene Bank origin for confirmation.

3.2.18. Expression of recombinant protein rHc23

3.2.18.A. Induction

The recombinant plasmids containing the Hc23 gene sequence were purified using plasmid miniprep kit and were used to transform *E. coli* B1 21(DE3). To assess the expression of Hc23, positive colonies were cultured in LB medium containing 25 μ g/ μ L kanamycin and incubated at 37 °C with shaking until OD 600 reached 0.5.

Increasing concentrations of isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) (Roche) (0 mM, 0.5 mM, 2 mM and 4 mM) were added and incubated at 37 °C with constant stirring at 2 to 4 h; aliquots of 1 mL from each culture were centrifuged at 13000 rpm for 10 min.

Cell pellets before and after induction were collected and analyzed by 12.5% SDS-PAGE. Gels were stained with Coomassie Blue R250 and the approximate quantity of the expressed protein was estimated by comparing the intensity of the protein bands. The same process was followed to get enough quantity of the recombinant protein using a 500 mL culture and 0.5 mM IPTG for 2 h at 37 °C with constant stirring and the pellets from induced cells were stored at -20 °C overnight for further protein extraction.

3.2.18.B. Solubilization

Cell lysis was carried out by sonication [ultrasonic homogenizers (Bandelin, Sonopuls)]. The pellet from 5 mL of *E. coli* culture was washed and resuspended in 1 mL lysis buffer [buffer I (20 mM Tris-HCl pH 8, 0.5 M NaCl, 5 mM Imidazol, β ME 10 mM)] and protease inhibitor tablet (complete mini EDTA free from Roche), using a 1.5 mL eppendorf tube. The suspension material was sonicated by a multi-step extraction scheme, using 1 mL buffer 1 (lysis buffer) (step 1) or buffer 2 (lysis buffer plus 0.3% Sarcosyl) (step 2) or buffer 3 (lysis buffer plus 0.5% Tween 20) (step 3); then the sonication was repeated with lysis buffer [buffer I plus different concentration of Sarcosyl 0.3% (buffer 2) (step 4), 0.15% (buffer 4) (step 5) and 0.05% (buffer 5) (step 6)].

The frequency was 20 kHz and the power was set to deliver a maximum of 70 watts. Each solution was sonicated in ice bath for 5 cycles. Each cycle consisted of 1 pulse of 1 min followed by 2 min incubation in ice. The sonicated solutions were subjected to centrifugation at 13000 rpm at 4 °C for 1 h. The soluble fraction and pellet were analyzed by 12.5% SDS-PAGE. After cell lysis, supernatants containing the protein in soluble form by the use of lysis buffer with 0.15% sarcosyl were immediately used for protein purification by affinity chromatography.

3.2.18.C. Purification

Purification of the recombinant His-6-tagged Hc23 protein was carried out in columns of 10 X 1 cm (GE-Healthcare) loaded with Ni-NTA agarose resin (QIAGEN) according to the method described by Zimmermann and Herberg (1998). The column was equilibrated with buffer I and loaded with sample with stirring at 4 °C for 1 h, the column was washed with 30 mL of buffer I and then 3 more washes with the same buffer but with different concentrations of imidazol [15 mM (20 mL), 30 mM (15 mL), 60 mM (10 mL)] and the protein was eluted with 3 mL of buffer I with 150 mM and 3 mL of buffer I with 250 mM concentration of imidazol; the purified fractions were analyzed by SDS-PAGE.

3.2.19. Dialysis and lyophilisation

Proteins were dialyzed in PBS buffer 1X and 0.1X using dialysis membrane SnakeSkin[®] pleated dialysis tubing 3.500 MWCO, 22 mm dry diameter (ID) × 35 ft (Thermo-Scientific). Proteins (Hc23) were concentrated by dry freezing using a LyoBeta lyophilizer system (Telstar S.A.).

3.2.20. Affinity chromatography with S-hexyl glutathione

Glutathione S-transferase (GST) was eliminated by affinity chromatography. The chromatography was carried out in columns of 10 X 1 cm (GE-Healthcare) loaded with S-hexyl glutathione combined by epoxy activation with an agarose gel according to Simons and Vander Jagt (1977). The column was equilibrated with PBS buffer pH 7 and the adult soluble extract of *H. contortus* (ASE) dialyzed against PBS and then loaded onto a column. The unbound fraction F1 (ASE without GST) was collected. The column was washed with NaCl 0.5 M. Reduced glutathione (GST) was eluted in 50 mM Tris-HCl pH 9.6 elution buffer.

The fractions were concentrated by adding 4 volumes of cold acetone and left for 2 days at – 20 °C. After that the fractions were centrifuged for 30 min at 3000 rpm at 0 °C, the supernatants were discarded and the sediments were dissolved in PBS solution and analyzed by SDS-PAGE 12.5%.

3.2.21. Elution of the protein from the membrane

Unbound ASE was fractionated by electrophoresis in a 12.5% polyacrylamide gel under denaturing and reducing conditions (SDS-PAGE) and electrotransferred to Immobilon P (Millipore, Bedford, MA, USA). The Hc23 fraction (native form) was detected using immune ovine sera (Domínguez-Toraño *et al.*, 2000; García-Coiradas *et al.*, 2010). Pieces of membrane containing the Hc23 fraction were excised and the bound peptides eluted with 1% Triton X100/ 2% SDS in 50 mM Tris-HCl pH 9.5 by adding 0.2-0.5 mL of this solution to every cm² of the membrane, vortexed about 20 min and centrifuged for 10 min at 1000 *xg* (Szewczyk and Summers, 1992). The protein was concentrated as mentioned in section 3.2.20 and Bradford method was used to determine the protein concentration (Bradford, 1976).

3.2.22. Immunoaffinity chromatography

Immunoaffinity chromatography was used for the purification of native protein with hyper immune serum against the recombinant protein obtained in rabbit.

3.2.22.A. Purification of polyclonal antibodies

The purification of polyclonal antibodies was carried out with protein A agarose (Roche) according to the manufacturer's instructions (https://e-labdoc.roche.Com/LFR.../ras/11_719408001en09.pdf).

- Starting buffer: 100 mM Tris-HCl pH 8
- Washing buffer 1: 100 mM Tris-HCl pH 8
- Washing buffer 2: 10 mM Tris-HCl pH 8
- Elution buffer: 100 mM Glycine pH 3
- Neutralization buffer: 1 M Tris-HCl pH 8

A 3 mL column of protein A agarose was prepared to purify 10-20 mg antibodies. The column was pre-equilibrated with 5 volumes of the starting buffer and the sample was clarified by centrifugation for 10 min at 10000 *xg*, refrigeration. The sample was slowly loaded into the column. The column was washed with 10 volumes of the washing buffer 1, then with 10 volumes of washing buffer 2 and the bound immunoglobulin eluted with elution buffer in the collecting tube which already contained a volume of neutralization buffer equivalent to 20% of the fraction size. The

fraction containing the immunoglobulins was measured (Absorbance at 280 nm) and the purified immunoglobulin was dialyzed against PBS. The polyclonal antibodies were concentrated and the concentration was determined with Bradford method (Bradford, 1976).

3.2.22.B. Coupling of purified Abs to Sepharose column

- PBS buffer
- Solution of HCl 1 mM
- Coupling buffer: 0.2 M ammonium bicarbonate and 0.5M NaCl pH 8.3
- Blocking buffer: 0.2 M Tris-HCl and 0.5M NaCl pH 8.3
- Washing buffer: 0.1 M sodium Acetate and 0.5M NaCl pH 4
- Storage buffer: PBS with 0.2 M Imidazol and 0.5 M NaCl pH 7

NHs activated sepharose HP column (GE-Healthcare) was washed with ice cold 1 mM HCl. Purified polyclonal antibodies were mixed with coupling buffer and were injected to the column where remained in contact with the column overnight at 4 °C. Uncoupled antibodies were removed by passing 3 volumes of the blocking buffer to block unreacted NHs sites and then the column was washed with 3 volumes of the washing buffer. The column with coupled antibodies was stored in the storage buffer to avoid microbial growth until use.

3.2.22.C. Immunoaffinity chromatography

- Equilibration buffer: PBS
- Elution buffer: 0.1M glycine-HCl pH 2.25
- Cleaning buffer: 100 mM sodium phosphate, 1.5 M NaCl pH 7.4
- Neutralization buffer: 2 M Tris-HCl, pH 8.6

The storage buffer was removed from the antibody column and replaced with the equilibration buffer at a flow rate of 1 mL /min. ASE of *H. contortus* was prepared as mentioned in section 3.2.26 and the protein concentration was determined with Bradford method (Bradford, 1976). ASE was loaded to the antibody column and was left in contact with the column overnight at 4 °C. The flowthrough was collected and the column was washed with equilibration buffer until A280 returned to the baseline. Protein was eluted with the elution buffer in the collecting tube containing the

neutralization buffer. The protein-containing fraction was measured by the absorbance at 280 nm and the purified protein was dialyzed against PBS. The antibody column was washed with 3-5 volumes with cleaning buffer, 3-5 volumes of the storage buffer were passed and the column was stored 4 °C until reuse (Subramanian, 2002).

3.2.23. Sequence analysis

The nucleotide sequence of PCR products and the positive bacterial clones in *E. coli* XL2- blue and BL 21 were determined by the Department of Genetics (Faculty of Veterinary Science, UCM, Madrid) and Genomics Service (Servicios Generales de Apoyo a la Investigacion, Universidad de La Laguna, La Laguna, Tenerife).

For the analysis of sequence similarity, domain identification and other features deduced from the DNA sequence, we used the BLAST programs of the National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). For the design of primers and analysis of DNA sequences or amino acids, the program Gene Runner V3.1 and Primer 3 was used. For studies of DNA or amino acids sequence homology Mega 2 and Clustal Programs were used.

The databases used for the identification of proteins according to the homology between the mass maps were: Protein Prospector (<http://prospector.ucsf.edu>), Source Database: NCBI Resources, NIH, Bethesda MD, USA, Matrix Science, MASCOT (<http://www.matrixscience.com>).

3.2.24. Experimental design and vaccination trial in lambs

When lambs reared for the vaccination trial (see section 3.1.2.A) reached 5-6 months of age, they were divided in a stratified manner (depending on weight) into 7 comparable groups consisting of 7 lambs each except for the group V (6 lambs) (Figure 3.2).

Group 1 (GI) was vaccinated with native Hc23 (Hc23) and group II (GII) with recombinant Hc23 (rHc23) and aluminium hydroxide [Al (OH)₃] (Sigma-Aldrich) as adjuvant. Immunizing injections were administered three times (100 µg) with an interval of 14 days between immunizations, in 1 mL of adjuvant by intramuscular and subcutaneous administration in the legs and the groin. Two weeks after the last

immunization, the two vaccinated groups and the unvaccinated and infected animals (group VI, GVI) were challenged with 15000 L3 of *H. contortus* administered by means of bucoesophagic catheter. In addition, group V (GV) animals were kept as the unvaccinated and uninfected control group until the end of the experiment.

Infected and challenged lambs (group VII, GVII) received 2 oral doses of 10000 L3 and reinfection with 15000 L3. The interval between inoculations was 56 days; the first infection was terminated by treating the lambs with Albendazole (Pfizer) (1 mL/10 Kg) at the day 35 post infection.

Group III (GIII) was vaccinated with Hc23 and group IV (GIV) with rHc23 and immunostimulant as adjuvant. Immunizing injections were administered four times (100 µg): on day 0, 48 hours after the infection with 15000 L3 of *H. contortus*, 1 week and 2 weeks after infection. Adjuvant was Lipopolysaccharide of *E. coli* cells + *Propionibacterium* spp. (1 mL/10 Kg live weight) and administered by intramuscular and subcutaneous injection in the legs and the groin region. At the end of the experimental period (45 days post infection, PI) all animals were slaughtered at a local abattoir (Villarejo de Salvanés, Madrid).

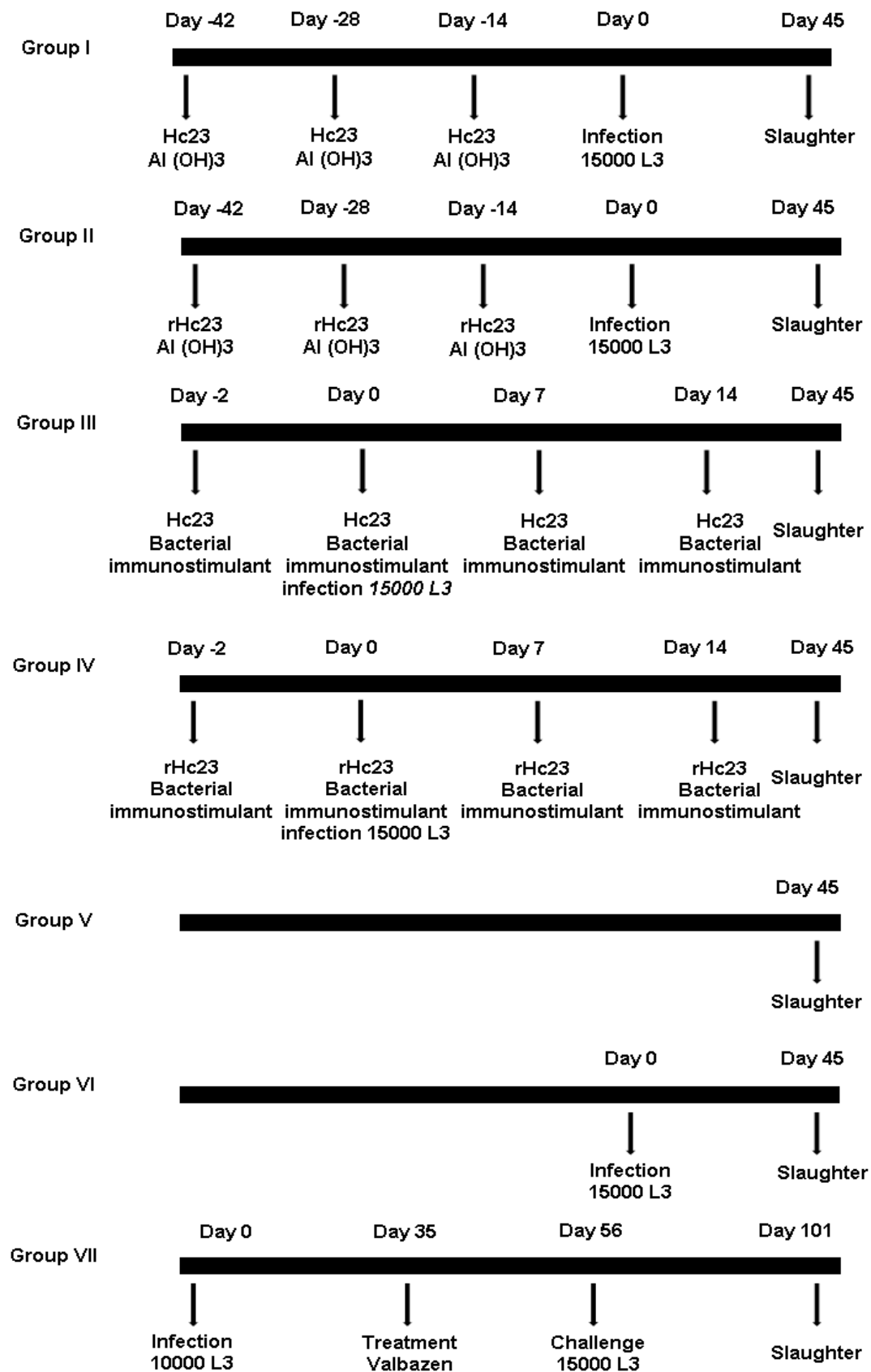


Figure 3.2. Experimental design.

3.2.25. Physiological and parasitological determinations

3.2.25.A. Fecal egg counts (FEC)

Individual fecal samples were taken on days 16 PI, 18 PI and 21 PI to determine the beginning of patency, and afterwards once a week. FEC was conducted using a modified McMaster technique (MAFF, 1971).

3.2.25.B. Fecal culture

Feces obtained from donor lambs were homogenized and disintegrated with tap water. Incubations of fecal material were made in 1000 mL plastic containers at 22-26 °C for 10 days. The cultures were removed daily and aerated. The larvae (L3) were then separated from the fecal material using the Baermann technique, cleaned and stored at 4 °C in tap water until use (MAFF, 1971).

3.2.25.C. Hematological analysis

Individual blood samples were taken by jugular venipuncture using evacuated tubes (Vacutainer) throughout the experimental period (inoculation of the immunogen, pre infection, prepatent period and the beginning and the end of the patent period of the infection). Samples were obtained with and without anticoagulant. Haematocrit values (Packed cell volume, PCV %) and leukocyte and eosinophil numbers were determined on the same days using standard laboratory techniques. To obtain sera, blood was left to clot at RT and the sera harvested after centrifugation at 2000 rpm for 25 min, divided into aliquots and preserved at -20 °C until tested.

3.2.25.D. Live body weight

The live weight of the animals was monitored 3 times during the experimental period (at the beginning, the day of infection and at the end of experiment) using a Tru-TestTM EziWeigh 2 scale system (0.1 Kg precision).

3.2.25.E. Recovery of adult *H. contortus*

The adult forms of *H. contortus* were recovered from the abomasa of experimentally infected lambs. After slaughter of the lambs, the stomachs were opened

and their contents placed in plastic containers. Adult worms were recovered following the technique described by Slotved *et al.* (1996). Briefly, a 2% agar solution (Difco, Bacto-Agar) was prepared by mixing the agar with tap water. This was heated to boiling point and then cooled to 48 °C in a water bath. Each sample of abomasal contents (100 mL) was mixed with 100 mL of the 2% agar at 48 °C. The suspension was then poured onto a tray in which disposable cloths had been placed horizontally in advance. In each tray the agar-gel had a thickness of approximately 0.4 cm. After a few min the agar-gel solidified. The cloth with the adhering agar-gel was then fixed to a stick and gently transferred to a plastic container and placed in a vertical position held up by a stick. The container was subsequently filled with 37 °C/0.9% saline and incubated at 37 °C overnight.

Next day the worms which migrated out of the gels and had sedimented on the bottom of the containers were collected. A 10% aliquot was taken, formaline fixed (5%) and preserved at RT until counting. Adult burdens, as well as female/male ratio were determined and the rest was deposited on cryogenic tubes and stored at -80 °C until use for extraction of protein or DNA.

3.2.26. Preparation of antigens (ASE and LSE)

The adult helminths were subjected to 8 cycles of freezing/thawing (-20 °C/ RT), followed by homogenization in a glass homogenizer and centrifuged (5000 xg, 4 °C, 30 min) (Klesius *et al.*, 1984). The protein layer was recovered with a pipette and stored at -80 °C (adult soluble extract, ASE). Similarly, L3 from fecal cultures were used to obtain larval soluble extract (LSE) by the same method but only subjected to three cycles of freezing/thawing (-20 °C/ RT). The protein layer was recovered with a pipette and stored at -80 °C (larval soluble extract, LSE).

3.2.27. Anti-rHc23 hyperimmune serum

Rabbit received 3 doses of the purified antigen, which were administered on days 0, 14, and 28. The animal received a first intramuscular injection with 20 µg of purified Hc23 in phosphate-buffered saline (PBS) in 1 mL of complete Freund's adjuvant (Sigma-Aldrich) and the other two doses were delivered in incomplete Freund's adjuvant (Sigma-Aldrich). On day 42, serum sample was obtained from the

animal by venipuncture in the ear. Sera were divided into aliquots and kept frozen at -20 °C until use.

3.2.28. ELISA and Western blotting

3.2.28.A. ELISA

The ELISA conditions were those described by Cuquerella *et al.* (1991). Antigens were employed at 5 µg/mL (ASE) or 1 µg/mL (rHc23) to coat 96-well microtiter plates using the coating buffer (0.05 M carbonate buffer pH 9.6) 16 h at 4 °C. Bovine serum albumin (BSA) 5% in PBS was used as blocking solution (1 h at 37 °C), sera were used at a 1/200 dilution in PBS-T (1 h at 37 °C) and the conjugate (alkaline phosphatase-labelled rabbit anti-sheep IgG, Sigma-Aldrich) was used at a 1/8000 (ASE) and 1/32000 (rHc 23) dilution (1 h at 37 °C). Color was developed with 1 mg/mL 4 p-nitrophenil phosphate disodium salt hexahydrate (Sigma-Aldrich) 30 min at 37 °C. Optical density (OD) at 405 nm was measured with Opsys MR microplate reader (Dynex Technologies).

3.2.28.B. SDS-PAGE and Western blotting (WB)

For electrophoresis protein was used at 1.25 mg/mL (ASE) or 250- 120 µg/mL (fractions) mixed with 1% Sodium dodecyl sulphate (SDS) and 5% βME (final concentrations). After boiling for 10 min, samples were electrophoresed into stacking gels (5% acrylamide) and running gels (9% or 12.5% acrylamide). Electrophoresis was conducted in electrophoresis buffer (0.025 M Tris, 0.192 M glycine and 0.1% SDS) and the gel was subjected to a potential difference of 80 V until the dye front (Bromophenol Blue) entered the separating gel. At this time, the potential difference was raised to 150 V and held until the end of the electrophoresis. After electrophoresis, the gels was stained for 2-4 h with standard Coomassie brilliant blue R-250 and destained with 40% methanol/ 7% acetic acid solution, or stained with silver nitrate 0.1% for 20 min at 4 °C and destained with solution of 2% sodium carbonate in formalin (35% formaldehyde) 0.04%, or transferred to Immobilon P membrane for western blotting (WB) using the Mini Trans-Blot Transfer Cell (Bio-Rad). This process was carried out at 150 mA for 2 h or 30 mA overnight in transfer

buffer (25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM glycine and 20% methanol) (Cuquerella *et al.*, 1991).

The WB conditions were as described previously (Cuquerella *et al.*, 1993). Briefly, protein samples were transferred to Immobilon P membrane and the membrane was stained shortly with Ponceau S (Sigma-Aldrich) to determine the efficiency of protein transfer. Membranes were washed 3 times with TBS-T, membranes were blocked with TBS-T and 5% powdered skimmed milk (blocking solution) (Molico, Nestlé) for 1 h at RT. After washing in the same manner the membranes were cut in strips and incubated with 1:100 sera in the case of primarily infected and challenged groups and 1:400 sera in the case of vaccinated groups, diluted in blocking solution for 3 h at 37 °C. After washing the membranes, the conjugate (horseradish peroxidase-labelled donkey anti-sheep IgG, Sigma-Aldrich) was used at 1: 1000 in the case of primarily infected and challenged groups and 1: 15000 in the vaccinated groups diluted in TBS-T (1 h, 37 °C) and color was developed with 4-chloro-1-naphthol (0.5 µg/mL, Bio-Rad) and hydrogen peroxide (0.015%, Sigma-Aldrich) for 10 min at RT. Finally the strips were washed in tap water to stop the color reaction. The hyperimmune rabbit sera were used at 1:100 dilution and the second antibody was goat anti-rabbit IgG (Sigma –Aldrich) at 1/15000.

3.2.29. Statistical Analysis

The data obtained were analyzed with the SPSS statistical package version 15. FEC and parasite recovery data (parasite burden) was log transformed to stabilize variance. Repeated measures analysis of variance was used for comparisons of EPG, PCV, peripheral eosinophil numbers, immunoglobulin (ELISA OD) and leukocytes. Parasite recovery data were compared by one way ANOVA and also the correlation relationship between different parameters (i.e. fecal egg counts and eosinophil counts) was calculated. For all tests, a *p* value below 0.05 was set as level of significance. All the figures of the vaccination trials were done with GraphPad Prism V5 software.

4. RESULTADOS

4.1. PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA NATIVA Hc23

El aislamiento y purificación de la proteína Hc23 de *H. contortus* se llevó a cabo empleando dos protocolos diferentes. El primero consistió en la extracción de la proteína desde membranas de nitrocelulosa, mientras que el segundo protocolo se basó en la purificación de la proteína utilizando anticuerpos específicos generados frente a la proteína recombinante (rHc23); en ambos casos se partió de un extracto soluble de helmintos adultos (ESA). Se siguió el esquema que se muestra en la Figura 4.1.

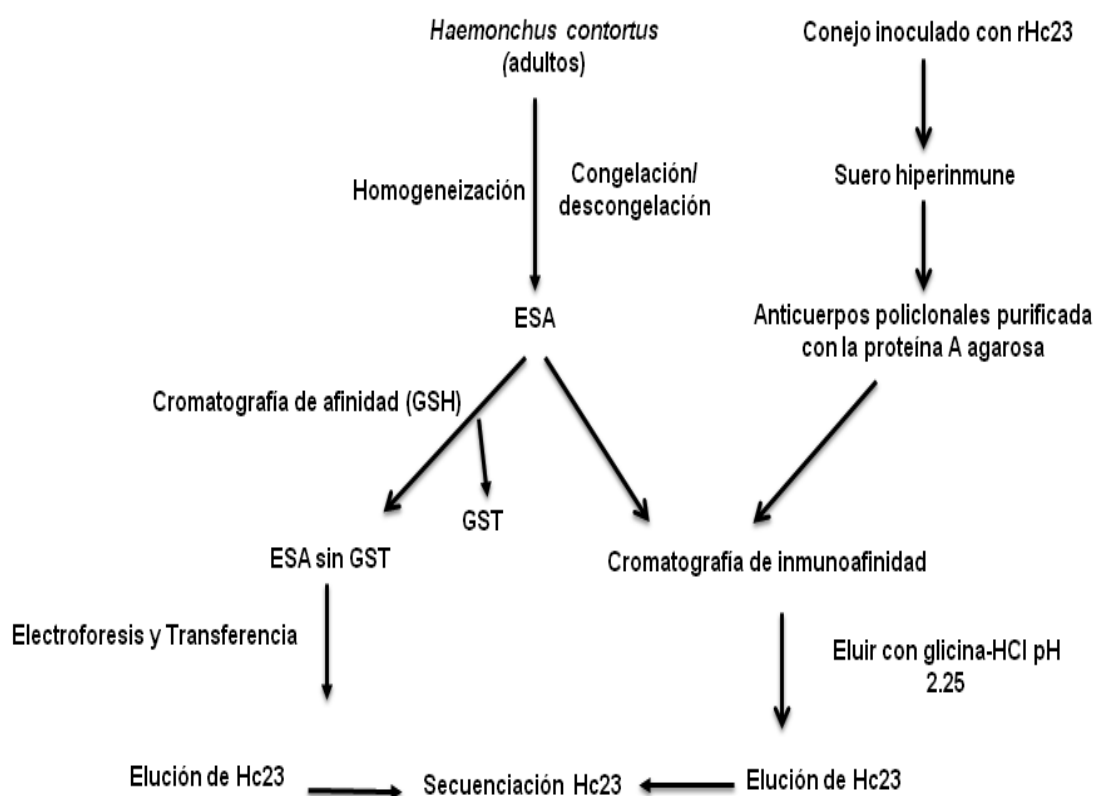


Figura 4.1. Esquema de aislamiento y purificación de Hc23 nativa.

4.1.1. Elución de la proteína desde la membrana

El extracto soluble de adultos, machos y hembras, de *H. contortus* (ESA) fue obtenido por ciclos de congelación-descongelación, sonicación y centrifugación. La purificación de Hc23 incluyó un paso previo para aislar y eliminar Glutathione-S-Transferasa (GST) – proteína abundante en helmintos adultos, de masa molecular similar, y sin efecto inmunoprotector (Sharp *et al.*, 1991) – mediante cromatografía de afinidad con S-hexilglutathione (Sigma), empleando GSH reducida en Tris pH 9.6 como tampón de elución.

Se observaron 3 picos claramente diferenciados; una primera fracción denominada F1 que incluía al ESA sin GST (que eluyó al inicio de la cromatografía), una segunda fracción o F2 que correspondía a las uniones inespecíficas (eluída con 0.5 M NaCl) y una tercera fracción o F3 que contenía la GST de *H. contortus* purificada de forma específica con 5 mM GSH, como se muestra en la Figura 4.1.1. Esta cromatografía de afinidad nos permitió eliminar a la GST de la región de 23-26 KDa, y así evitar su posible interferencia en la purificación de Hc23.

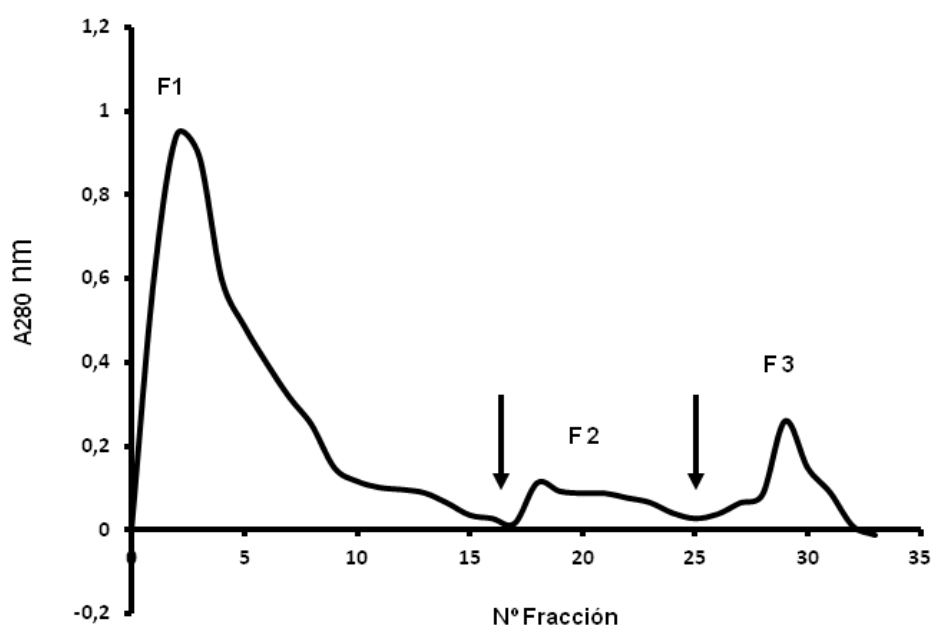


Figura 4.1.1. Perfil de elución de la cromatografía de afinidad para la extracción de la GST a partir de ESA de *H. contortus*. F1, ESA sin GST. F2, uniones inespecíficas. F3, GST.

El extracto parasitario no unido (ESA sin GST) (F1) se fraccionó en geles de poliacrilamida al 12.5% en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE) y fue electrotransferido a Immobilon P para localizar la proteína Hc23 en la membrana de transferencia (Figura 4.1.2). Se realizaron inmunorreconocimientos “Western blots” con sueros que contenían anticuerpos específicos frente al parásito, procedentes de experimentos previos. Se cortaron las piezas de membrana que presentaba Hc23 y la proteína unida se eluyó con 1% Tritón X 100/2% SDS en 50 mM Tris-HCl pH 9.5, se concentró con acetona fría y se procedió a su análisis mediante SDS-PAGE, con el fin de comprobar tanto la presencia como la pureza de la proteína.

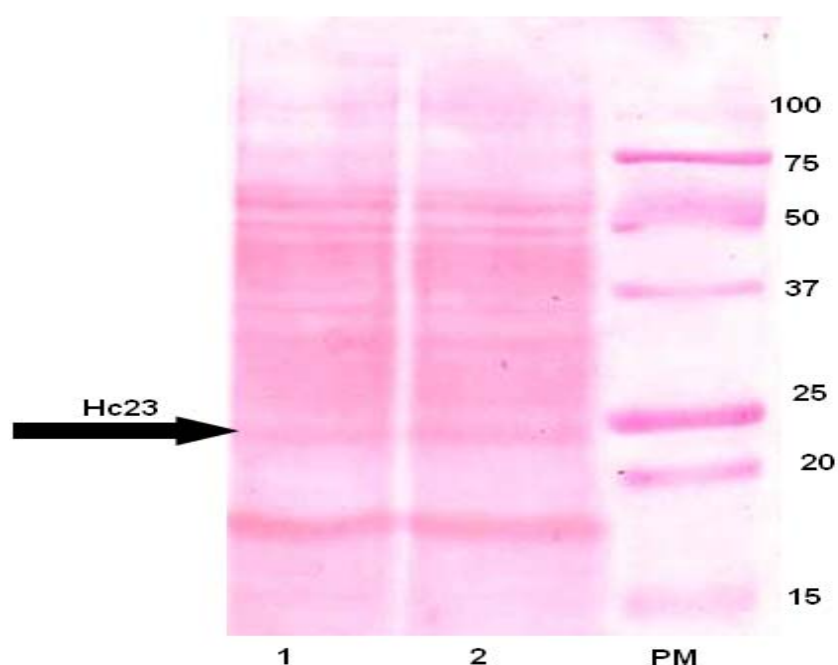


Figura 4.1.2. ESA sin GST transferido en Immobilon P teñido con rojo Ponceau S. Carriles 1 y 2, ESA sin GST. PM, marcador de peso molecular en KDa.

4.1.2. Obtención de Hc23 mediante inmunoadsorción (con anticuerpos específicos (frente a rHc23) y ESA de *H. contortus*)

Mediante cromatografía de afinidad se consiguió la purificación de la proteína nativa en un solo paso, sin necesidad de eliminar previamente la GST de la región de 23-26 KDa. Los sueros hiperinmunes anti rHc23 se obtuvieron mediante inoculación en conejo (raza Nueva Zelanda, blanco) de 150 µg de rHc23 (I/M -3 veces). La primera inoculación se realizó con 1 mL de adyuvante completo de Freund, mientras que para la

segunda y la tercera inmunización se utilizó adyuvante incompleto de Freund. Dos semanas después de la última inoculación se obtuvieron los sueros hiperinmunes.

La especificidad de estos sueros se analizó mediante SDS-PAGE y Western blotting, comprobando los inmunorreconocimientos tanto de la proteína Hc23 nativa como de la recombinante. Mediante ELISA se determinaron los títulos de los anticuerpos específicos y se observó una respuesta de IgG muy elevada.

Los anticuerpos policlonales que fueron purificados mediante proteína A agarosa se emplearon para el aislamiento de la proteína Hc23 nativa mediante cromatografía de inmunoadfinidad, con una columna de Sepharosa 4 activada con NHS-HP.

La proteína así purificada fue analizada mediante SDS-PAGE y Western blotting y se apreciaron 2 bandas, una de 23 KDa (Hc23) y la otra de 46 KDa (posiblemente un dímero) (Figuras 4.1.3 y 4.1.4). La proteína aislada y purificada mediante este método mostró un mayor rendimiento a la vez que su obtención fue menos laboriosa y más rápida.

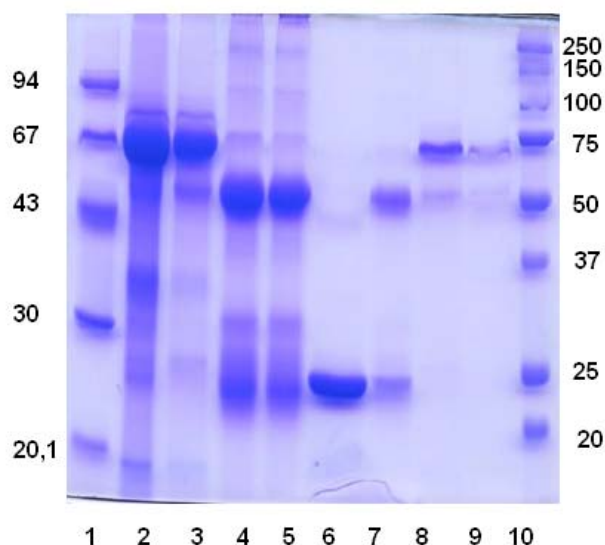


Figura 4.1.3. Análisis electroforético (SDS-PAGE) de las fracciones obtenidas en la purificación de Hc23 (nativa) teñidas con azul de coomassie. Carriles 1 y 10, marcador de peso molecular en KDa. Carril 2, fracción no unida. Carriles 3-5, eluato con tampón de equilibrado. Carril 6, eluato de la Hc23 con tampón de elución (glicina-HCl pH 2.25). Carriles 7-9, eluato con tampón de lavado.

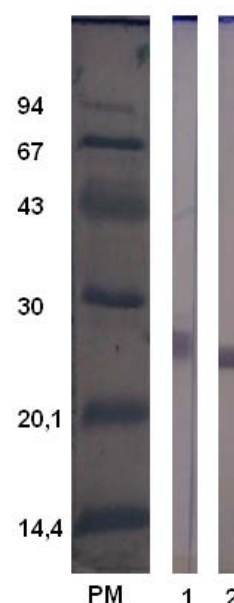


Figura 4.1.4. Inmunodetecciones realizadas con Hc23 nativa. Carril 1, enfrentadas el suero hiperinmune de conejo obtenido frente a rHc23. Carril 2, sueros de ovejas inmunizadas con p26/23. A la izquierda se muestran los marcadores en PM en KDa.

4.2. OBTENCIÓN (CLONACIÓN Y EXPRESIÓN) DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE Hc23 (rHc23)

Para la obtención de la secuencia completa de la proteína Hc23, su clonación en el vector pET-29 b (+) y la posterior expresión de su proteína recombinante (rHc23) se realizó el diseño metodológico mostrado en la Figura 4.2. Se siguieron 2 líneas de actuación, por una parte (A) se procedió a la construcción de una biblioteca cADN de *H. contortus* de alta calidad que nos permitiera obtener la amplificación de fragmentos de ADN de más de 600 pb, y por otra parte (B) se llevó a cabo la purificación de la fracción proteica p26/23 clonada en el vector pGEM-T que se encontraba en colonias de *Escherichia coli* (procedentes de estudios previos y que se mantenían a -80 °C hasta su utilización), con el fin de obtener una sonda marcada que permitiera el posterior

reconocimiento de la secuencia completa del gen que codificaba la proteína Hc23 en la genoteca del parásito.

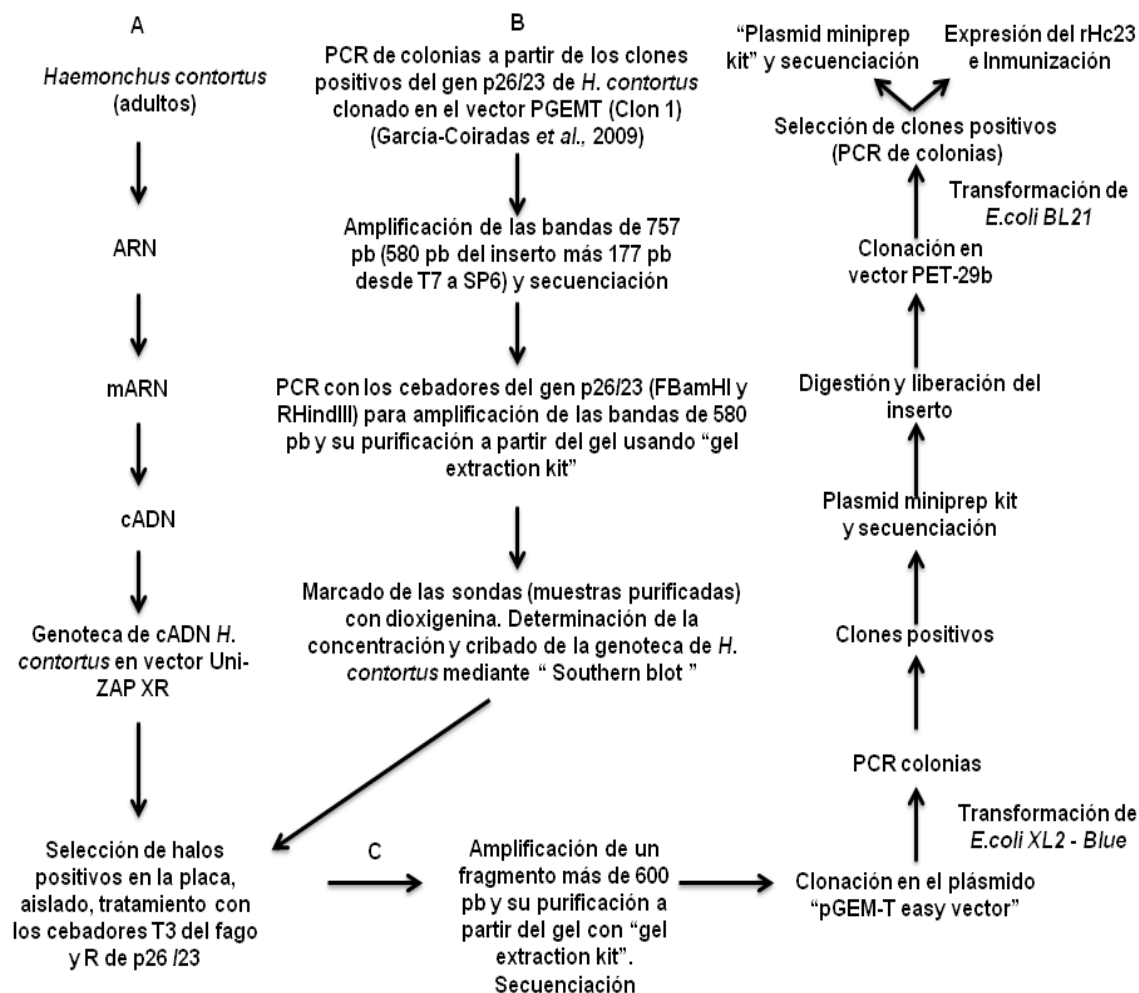


Figura 4.2. Esquema de expresión y purificación de la rHc23.

4.2.1. Obtención de una biblioteca de cADN de *Haemonchus contortus* (Figura 4.2.A)

4.2.1.A. Aislamiento de ARN total

Se realizaron pruebas de extracción y conservación del ARN parasitario, con el fin de obtener la mayor calidad del mismo. En este sentido, tras la extracción del ARN [partiendo de adultos (machos y hembras) de *H. contortus*] se conservó a -80°C con "ARN later" y sin él, observándose una mayor rendimiento cuando las muestras eran mantenidas con ARN later. Para la extracción se utilizaron 3 métodos diferentes

(Maxwell 16 Total RNA Purification kit, Illustra RNAspin mini isolation kit y Tri-Reagent). Nuestros resultados mostraron que, cuando se utilizó el método tradicional con Tri-Reagent, se observaron 3 bandas de rARN que correspondían a 28S, 18S y 5S, mientras que mediante el empleo de los otros dos métodos, se observaron una banda (18S) y dos bandas (28S y 18S), respectivamente. Cabe señalar que la utilización del método tradicional con Tri-Reagent mostró una menor degradación de ARN, observándose una intensidad superior en el bandeo que con los otros dos métodos. Asimismo, las bandas de las subunidades 28S y 18S detectadas con el método tradicional evidenciaron una mayor intensidad (el doble) que la tercera subunidad (5S). A esto hay que sumarle que el ARN obtenido por el método tradicional tenía un peso molecular superior al obtenido mediante los otros 2 métodos, lo que apunta a una menor degradación (Figura 4.2.1).

La cuantificación del ARN obtenido con el método tradicional (Tri-Reagent) mostró (por espectrofotometría) que la relación DO 260/280 era superior a 2, con una concentración de 122.345µg/50µL en la muestra conservada con “ARN later” y de 109.955µg/50µL en la muestra sin “ARN later”.

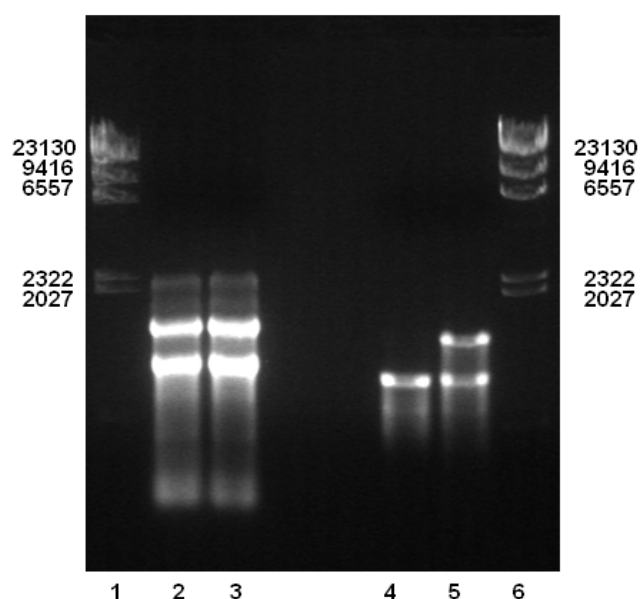


Figura 4.2.1. Extracción del ARN en gel de agarosa 1%. Carriles 1 y 6, marcador II. Carril 2, ARN de *H. contortus* (RNA later) con Tri-Reagent. Carril 3, ARN de *H. contortus* (sin RNA later) con Tri-Reagent. Carril 4, ARN de *H. contortus* (RNA later) con Maxwell 16 tissue LEV total RNA purification kits. Carril 5, ARN de *H. contortus* (RNA later) con RNA spin mini-RNA isolation kit.

4.2.1.B. Obtención de ARN mensajero (mARN) y síntesis de cADN de *H. contortus*

El ARN mensajero se obtuvo a partir del ARN total usando "Absolutely mRNA purification kit" y se cuantificó mediante espectrofotometría, obteniéndose una relación de DO 260/280 superior a 2 (Figura 4.2.2). La primera cadena de cADN se elaboró utilizando 3 μ g de mARN; seguidamente el cADN fue digerido con la enzima XhoI, lo que permitió tener al cADN flanqueado por dos dianas de restricción (EcoRI y XhoI) a la vez que determinó su correcta orientación.

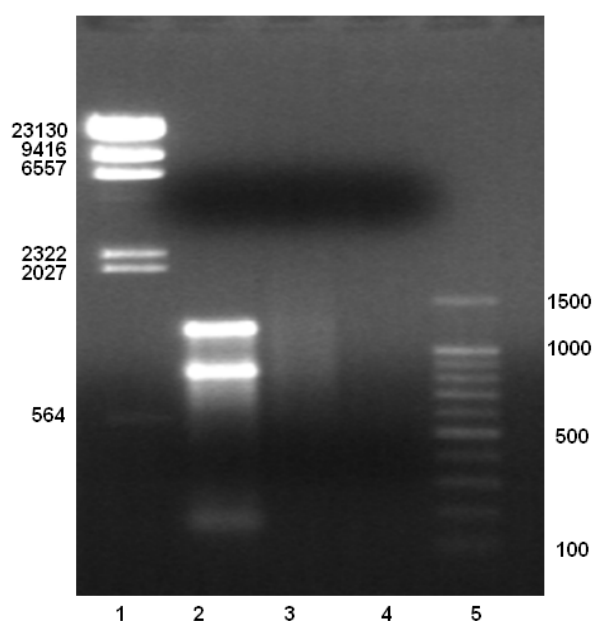


Figura 4.2.2. Extracción del mRNA en gel de agarosa 1%. Carril 1, marcador II. Carril 2, rRNA sin mRNA (1 µL). Carril 3, mRNA (elución 1) (3 µL). Carril 4, mRNA (elución 2) (10 µL). Carril 5, marcador 100 pb.

4.2.1.C. Fraccionamiento del cADN

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa con el cADN obtenido y se seccionó en 3 partes, la primera sección correspondió a la fracción comprendida entre 0.5 a 2 Kb, la 2ª fue desde 2 a 4 Kb y la 3ª y última de más de 4 Kb (Figura 4.2.3). Las fracciones se electroeluyeron y se procedió a su cuantificación mediante espectrofotometría. El resultado se muestra en la tabla 4.A. donde se aprecia que el cADN obtenido en las 3 fracciones fue de gran pureza ($260/280 > 1.5$), superior en la primera fracción (0.5 a 2 Kb), con un valor obtenido de 1.72 para la relación de 260/280 y una mayor concentración de 126 ng/µL, comparado con las otras fracciones, donde la tercera fracción mostró la menor pureza (1.55) y la concentración mínima (25.7 ng/µL).

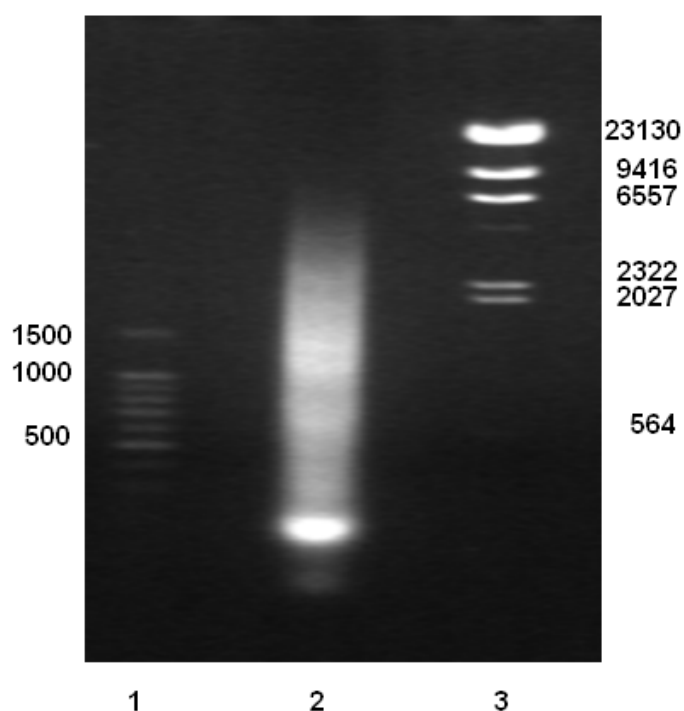


Figura 4.2.3. cADN de *H. contortus* en gel de agarosa 0.8%. Carril 1, marcador 100 pb. Carril 2, cADN de *H. contortus*. Carril 3, marcador II.

Tabla 4.A. Cuantificación espectrofotométrica de las 3 fracciones del cADN de *H. contortus*.

Parámetro	cADN 0.5-2 Kb	cADN 2-4 Kb	cADN >4 Kb
Concentración	126 ng/μL	66.1 ng/μL	25.7 ng/μL
λ 230	2.214	1.399	1.609
λ 260	2.521	1.321	0.513
λ 280	1.468	0.792	0.331
260/280	1.72	1.67	1.55
260/230	1.41	0.94	0.51

4.2.1.D. Titulación de la genoteca

La ligación del cADN se llevó a cabo con el vector uni- ZAP XR y la enzima T4 ADN ligasa (4 U/μL); a continuación se procedió al empaquetamiento de los fagos mediante la adición de los componentes de ligación al extracto de empaquetamiento (Gigapack III Gold). Se realizaron diluciones de los bacteriófagos de cada genoteca (1,

1:10, 1:100) y se pusieron en contacto con las células bacterianas cultivadas en placas de NZY-amina agar, para su incubación a 37 °C según el esquema que se muestra en la Figura 4.2.4. Los halos formados como consecuencia del crecimiento de los fagos fueron visibles en unas 6-8 h y se cuantificaron [en unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/mL)] para determinar el título de cada genoteca (Tabla 4. B).

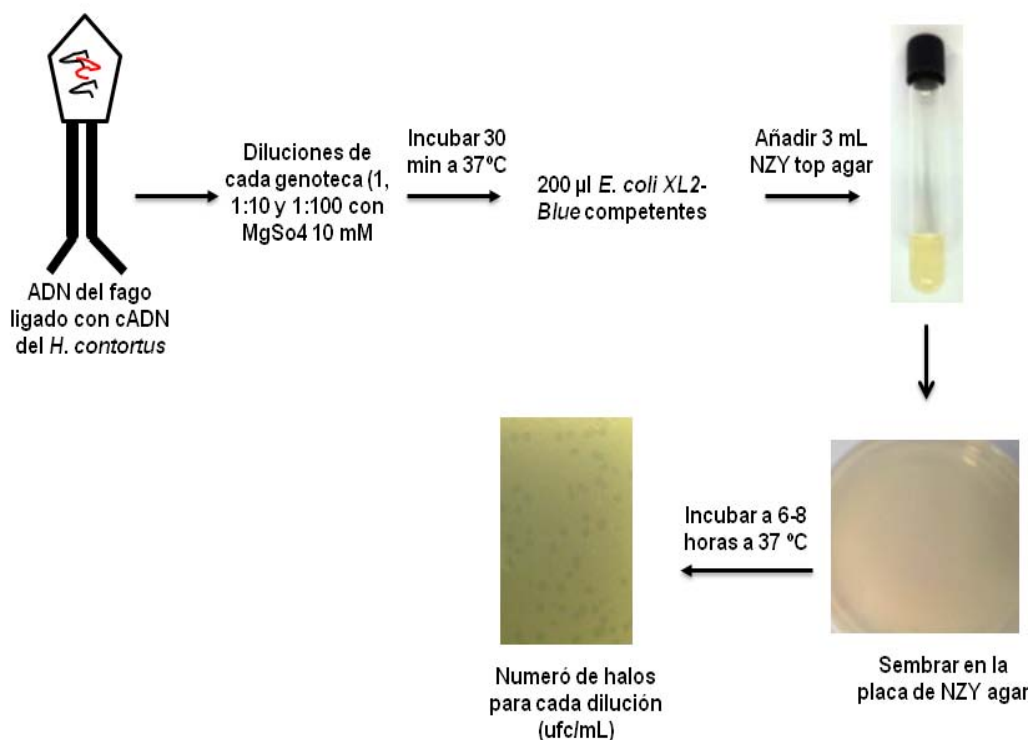


Figura 4.2.4. Esquema de titulación de cADN λZAPII de *H. contortus*.

Tabla 4.B. Recuento del número de halos correspondientes al crecimiento de cada genoteca en la cepa bacteriana *E. coli* XL1-Blue.

Diluciones	Genoteca 0.5-2 Kb	Genoteca 2-4 Kb	Genoteca >4 Kb
1	>1000	>1000	372
1:10	439	364	13
1:100	96	58	2

Para titular las genotecas se utilizaron las placas de cultivo que contenían la mayor dilución del fago (placas n° 3), excepto para la genoteca > 4 Kb en la cual se utilizó la placa número 1, ya que el cADN era de mayor tamaño y por tanto no presentaba el mismo nivel de crecimiento que los de las otras genotecas.

Titulación de la genoteca de *H. contortus* obtenida [unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/mL)]

1. Genoteca 0.5-2 Kb 9.6×10^6 ufc/mL
2. Genoteca 2-4 Kb 5.8×10^6 ufc/mL
3. Genoteca >4 Kb 3.7×10^5 ufc/mL

4.2.1.E. Amplificación de la genoteca de *H. contortus*

La amplificación se realizó de igual forma que la titulación. Las placas se incubaron durante 6-8 h a 37 °C y cuando los halos medían entre 1-2 mm de tamaño se les añadió 8-10 mL de tampón SM por placa y se mantuvieron a 4 °C, con agitación suave, durante toda la noche. Al día siguiente se recogieron los sobrenadantes y se les añadió un 5% de cloroformo, se realizaron diluciones ($1:10^3$; $1:10^4$; $1:10^7$) para su posterior titulación. Se almacenaron a - 80 °C con un 7% de DMSO.

El número de halos cuantificados en la placa número 3 (dilución $1:10^7$) de cada genoteca fue:

1. Genoteca 0.5-2 Kb 3×10^{10} ufc/mL
2. Genoteca 2-4 Kb 7.6×10^{10} ufc/mL
3. Genoteca > 4 Kb 5.7×10^{10} ufc/mL

4.2.1.F. Determinación de la calidad de la biblioteca de cADN de *H. contortus*

Para determinar la calidad de la biblioteca antes de realizar en Southern blotting se llevó a cabo una PCR a partir de los fagos usando los cebadores T7 y T3. Se utilizaron los halos generados por los fagos cultivados en placas de agar NZY amina con las 3 bibliotecas y las bandas amplificadas mostraron un peso entre 500 y 5000 pb (Figura 4.2.5) lo que indicaba que las bibliotecas obtenidas fueron muy representativas del genoma de *H. contortus* y de alta calidad.

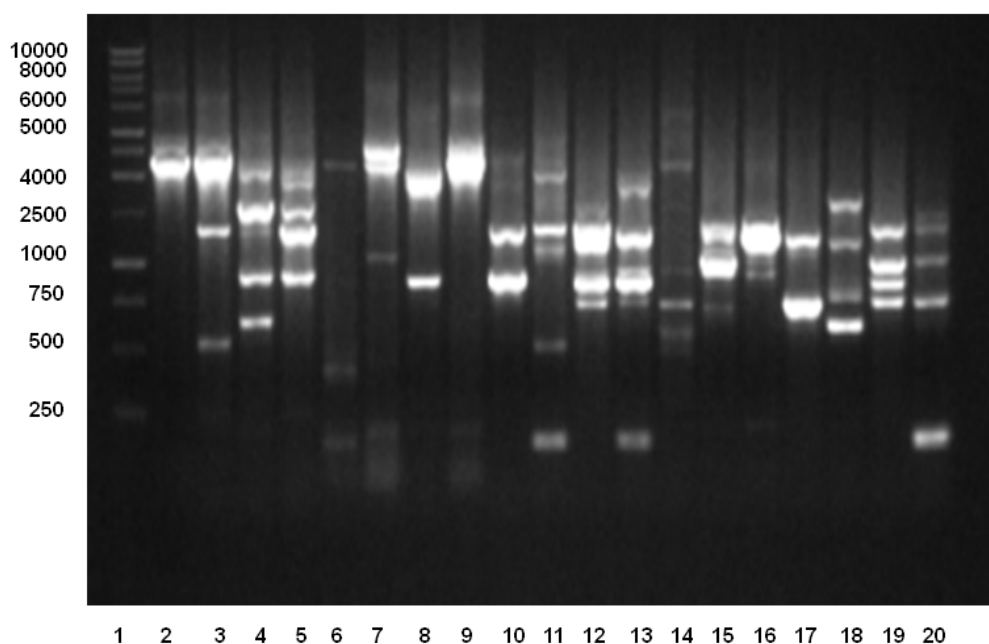


Figura 4.2.5. Carril 1, marcador de peso molecular en pb. Carriles 2-19, PCR de bacteriófagos ZAPII de la genoteca de cADN de *H. contortus*.

4.2.2. PCR de las colonias de *E. coli* con el inserto del gen que codifica Hc23 en el plásmido pGEM-T (Figura 4.2.B)

Para realizar la PCR colonia, se utilizaron colonias de *E. coli* positivas (gen de Hc23 defectivo clonado en el plásmido pGEM-T) que estaban conservados a -80 °C procedentes de experimentos anteriores (García Coiradas *et al.*, 2009). Se utilizaron asimismo los cebadores del plásmido SP6 (5' ATT TAG GTG ACA CTA TAG AA 3') y T7 (5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3'), que permitieron la amplificación de un fragmento de 757 pb (580 pb del inserto y más 177 pb que correspondían a los cebadores T7 y SP6) (Figura 4.2.6). Se escogieron las 3 colonias que presentaban la mayor pureza en la amplificación (colonias 2, 3 y 5), se purificaron las tres bandas (una por colonia) desde el gel y se procedió a su secuenciación (Laboratorio de Genética, Facultad de Veterinaria, UCM, Madrid).

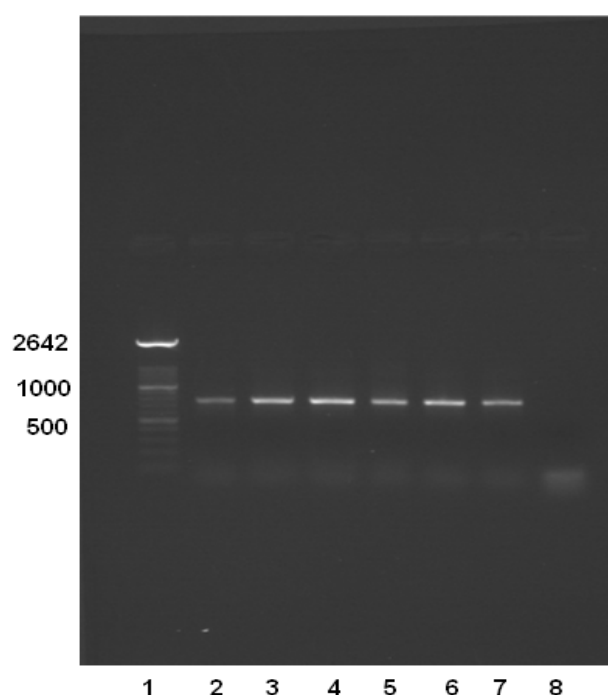


Figura 4.2.6. Carril 1, marcador en peso molecular en pb. Carriles 2-7, PCR de colonias bacterianas *E. coli* XL2-Blue transformadas con pGEM-T ligando al inserto (757 pb). Carril 8, control negativo.

El resultado fue coincidente con la secuencia anterior del gen que codifica Hc23, lo que nos permitió usar los cebadores del inserto FBamHI y RHindIII (FBamHI: 5' GCA GGA CTG TTC GCA CAT 3', RHindIII: 5' TCA GTC TTT CGC GGA CTT G 3'), obteniéndose una amplificación de un fragmento de 580 pb (Figura 4.2.7). A continuación se eligieron 2 colonias que presentaron la mayor pureza en amplificación (colonias 2 y 3) se purificaron las dos bandas (1 por cada colonia) desde gel usando gel extracción kit (QIAGEN), posteriormente se repitió la PCR con estas dos colonias usando los mismos cebadores y se procedió al marcaje de la sonda mediante DIG-DNA labeling mix.

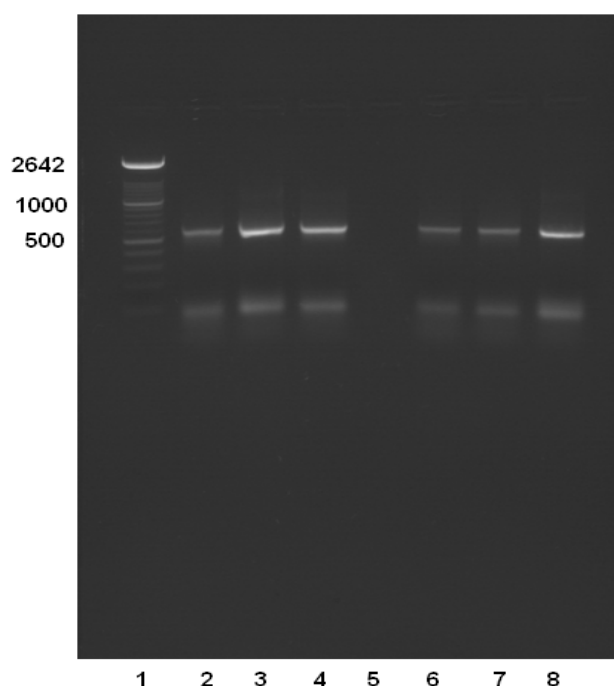


Figura 4.2.7. Carril 1, marcador en peso molecular en pb. Carriles 2-4, 6-8, Producto de PCR obtenido tras amplificación con los cebadores FBamHI y RHindIII del gen Hc23 (580 pb). Carril 5, control negativo.

4.2.3. Construcción de la sonda de ADN de la proteína Hc23 de *H. contortus*

Una vez comprobada la presencia del inserto se utilizó como molde para marcar el fragmento Hc23, mediante una PCR, con dUTP digoxigenina. Seguidamente la sonda marcada se cuantificó utilizando el kit marcaje de ADN con dioxigenina (Roche Diagnostic). La detección de la sonda marcada se realizó mediante el reconocimiento inmunológico usando DIG-DNA labeling kit (Roche). La Figura 4.2.8. muestra la concentración ideal de la sonda marcada cuando se comparó con diferentes diluciones del ADN marcado. Finalmente el ADN marcado se almacenó a -20°C hasta su uso. La concentración óptima de la sonda utilizada fue de $25\text{ ng}/\mu\text{L}$. Dicho ADN marcado se utilizó posteriormente para detectar el gen que codifica la proteína Hc23 en la genoteca del *H. contortus* y proceder así a la secuenciación completa del gen.

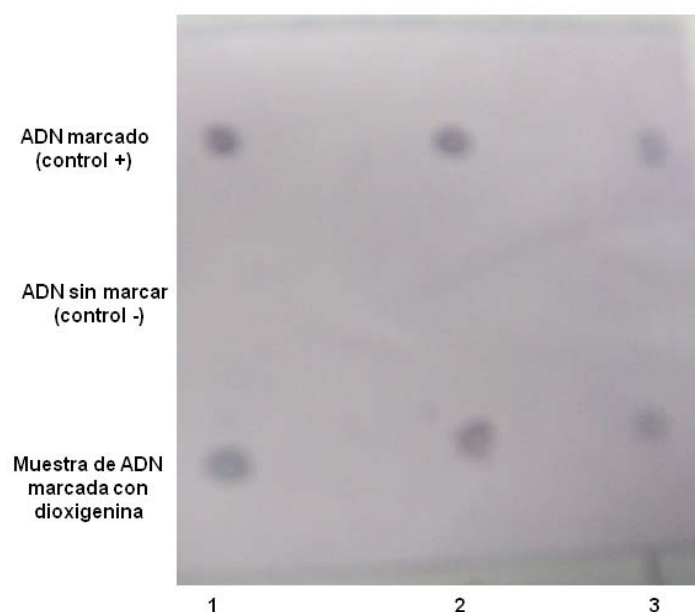


Figura 4.2.8. Sondas marcadas con dioxigenina. Carril 1, dilución 1:10. Carril 2, dilución 1:100 Carril 3, dilución 1:1000.

4.2.4. Southern-blot con sondas marcadas con dioxigenina

La búsqueda del gen que codifica la proteína Hc23, se realizó utilizando la sonda homóloga construida denominada Hc23 (incompleta).

Se utilizaron diluciones de 10^{-4} de la genoteca de cADN, que hicieron un total de 1.2×10^4 unidades formadoras de calvas (ufc) escrutadas. Se usó la sonda a una concentración de 25 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$, bajo condiciones altamente astringentes (68 °C). En un primer análisis se seleccionaron 6 halos positivos. Un segundo estudio se realizó con 3 de los halos positivos obtenidos y en el tercer y último análisis se seleccionaron 8 calvas positivas.

La presencia del gen de la Hc23 en los 8 fagos aislados, se comprobó mediante una reacción de PCR utilizando los cebadores FBamh I and RHind III. Los ocho fagos aislados generaron el amplicón de 580 pb, lo que indicaba la presencia del gen en los fagos, sin embargo quedaba por comprobar si este estaba completo.

Para aislar el gen completo de la Hc23 se utilizaron las muestras del amplicón de 580 pb obtenido. Este fragmento fue purificado, mediante el sistema de extracción de QIAquick (QIAGEN) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las muestras

purificadas fueron sometidas a amplificación por PCR utilizando los cebadores T3 del fago y R final de la secuencia genómica de la proteína para la consecución de la secuencia completa. Finalmente se obtuvo un amplicón de 612 pb (Figura 4.2.9).

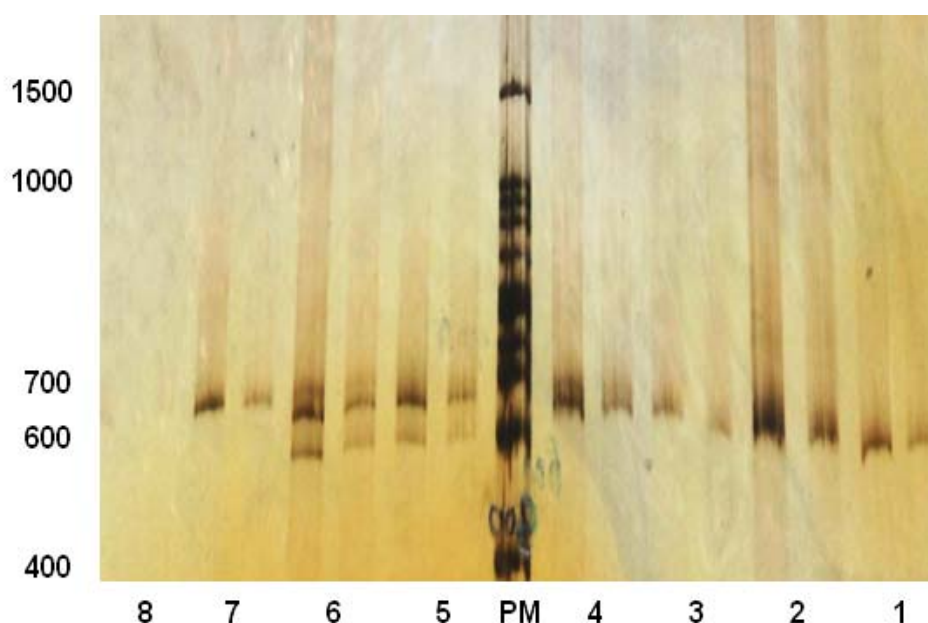


Figura 4.2.9. Gel de acrilamida 9% teñido con plata. Carriles1- 7, amplificación de la Hc23 a partir de biblioteca de cADN de *H. contortus* con los cebadores T3 y R. Carril 8, control negativo. En medio, PM, marcador en peso molecular en pb.

Tras la secuenciación del amplicón obtenido a partir de los halos positivos de la biblioteca de cADN de *H. contortus* se obtuvo la secuencia completa del gen que codifica la proteína Hc23, siendo posible el diseño de los cebadores pET-HcR y pET-HcF para dicho gen (Figura 4.2.10).

1	ATGC	60
61		120
121	GACCAAGCAAAGCTGAAAGATATTTGGAAGAACTGGAAGGAAGGCGATAAGTGCTATCAT	180
181		240
241	AGCAAGGATGCACTTCTGCCACCGCCTGTGAGGAAGGCGCCAGAAGAAGTCCAGGAACAG	300
301		360
361	GAAGTAGCACAGAAGGTTCTCACTGGTGACAATCTCAAGGAGTATAACGAATTCAGTGC	420
421		480
481	AAGGCGGCATACGACAAGATCGCCAAATTGGAAGGAGAAACACGATATTATTGCATCG	540
541		600
601	AAAGACTGA	612

Figura 4.2.10. Secuencia de nucleótidos de la proteína Hc23 más las secuencias de nucleótidos de los cebadores pET-HcR y pET-HcF.

Una vez determinada la secuencia de nucleótidos completa que codifica la proteína Hc23 de *H. contortus* y diseñados los cebadores, se realizó una PCR colonia desde la biblioteca del fago usando dichos cebadores, lo que permitió amplificar directamente una banda de 612 pb (Figura 4.2.11), la cual fue purificada usando el kit “gel extracción kit” (QIAGEN). A continuación se determinó la concentración de ADN usando espectrofotometría, y se obtuvieron concentraciones de 23.2 ng/μL para la muestra número I y de 41.3 ng/μL para la muestra número II. Las muestras se conservaron a - 20 °C hasta su uso para el clonaje en el vector pGEM-T easy.

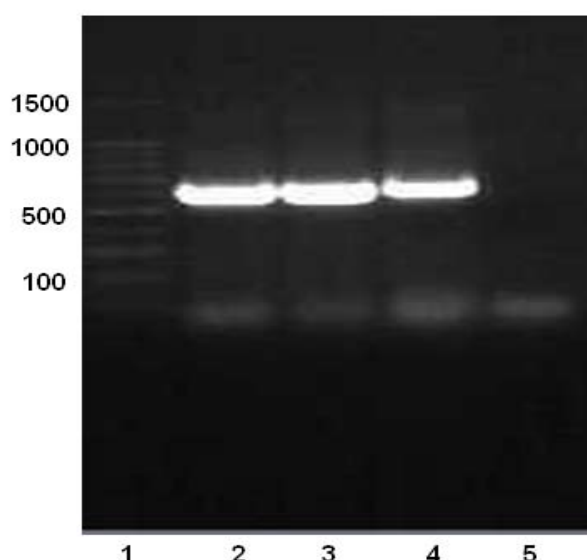


Figura 4.2.11. Carril 1, marcador en peso molecular en pb. Carriles 2-4. ADN de Hc23 con cebadores pET-HcF y pET-HcR (más de 600 pb) usando biblioteca del cADN de *H. contortus*. Carril 5, control negativo.

4.2.5. Clonación de Hc23 en el vector pGEM-T easy (Figura 4.2.C)

Se utilizaron tres relaciones molares inserto:vector 1:1, 1:3 y 3:1. El plásmido pGEM-T, facilita el clonaje de productos de PCR porque posee colas de timidinas en ambos extremos libres del vector linearizado, las que han de hibridar con las poliadeninas incorporadas por las Taq polimerasa en los extremos del producto amplificado. Además de esta característica como otros vectores presenta dianas para diversas enzimas de restricción que flanquean al inserto de ADN clonado, lo que facilita su secuenciación. Se realizaron miniprep para la extracción del plásmido y se usaron los cebadores T7 y SP6 del plásmido, obteniéndose una banda de casi 800 pb (612 pb del inserto más 177 del plásmido) (Figura 4.2.12).

Se eligieron 4 colonias al azar de entre las que presentaban una mayor pureza en su amplificación (colonias 1,2,4 y 6), a partir de las cuales se extrajo el plásmido para su secuenciación (Servicio de Genómica, Servicios Generales de Apoyo a la Investigación, Universidad de La Laguna, Tenerife). La secuenciación permitió determinar la pauta de lectura correcta del fragmento y seleccionar el vector de expresión.

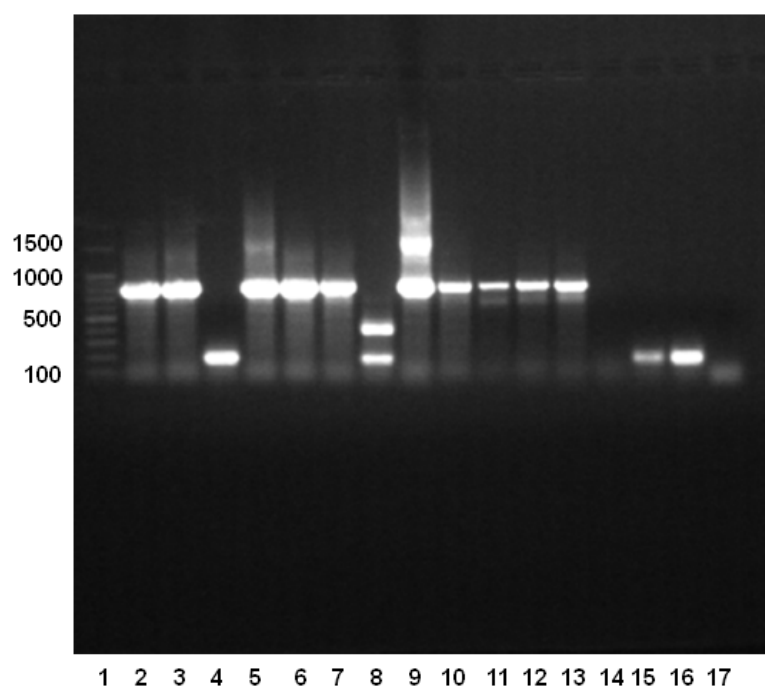


Figura 4.2.12. Carril 1, marcador en peso molecular en pb. Carriles 2-14. PCR de colonias bacterianas de *E. coli* XL2 blue transformadas con el vector p-GEMT-easy ligado al inserto con los cebadores SP6 y T7. Carriles 15-17, control negativo.

4.2.6. Liberación del inserto

Inicialmente se procedió a la extracción (miniprep extraction kit) del plásmido que contenía en su ADN el inserto clonado, a continuación se liberó el inserto mediante la digestión con enzimas de restricción NdeI y XhoI. Se repitió el proceso de digestión enzimática también en el vector de expresión pET-29 b (+), con el fin de permitir la ligación del inserto en el nuevo vector (Figuras 4.2.13 - 4.2.15).

Se eligió el plásmido pET-29 b (+) para la expresión de la proteína recombinante ya que proporcionaba una pauta de lectura correcta, además de añadir una cola de histidinas en el extremo amino terminal de la proteína, facilitando su posterior purificación mediante cromatografía de afinidad con columnas de Ni-NTA.

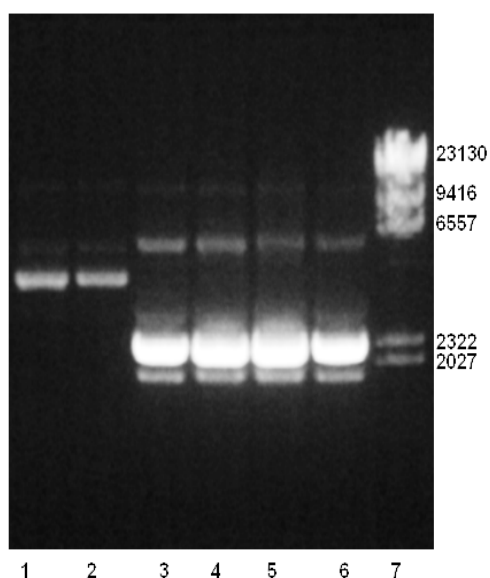


Figura 4.2.13. Carriles 1 y 2, pET-29 b (+) sin digerir. Carriles 3-6, PGT-Hc 1,2,3,4 sin digerir. Carril 7, marcador en peso molecular en pb.

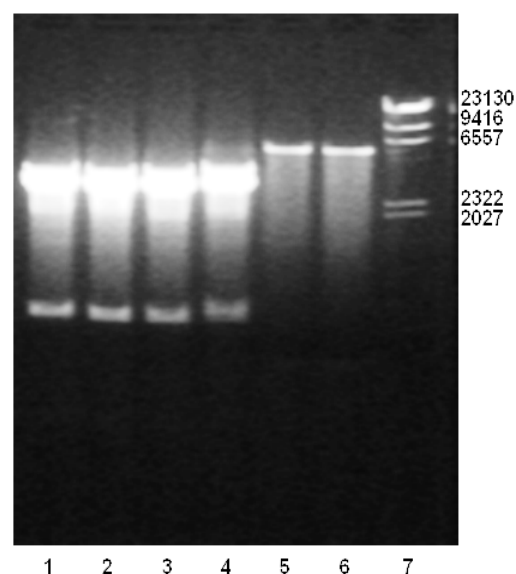


Figura 4.2.14. Carriles 1-4, las colonias 1,2,3,4, PGT-Hc digeridas con Nde1 y Xho1. Carriles 5-6, vector pET-29 b (+) digerido con Nde1 y Xho1. Carril 7, marcador en peso molecular en pb.

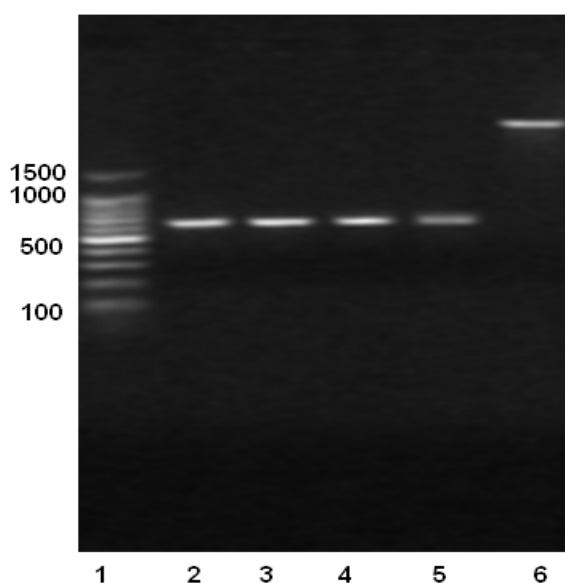


Figura 4.2.15. Carril 1, marcadores en peso molecular en pb. Carriles 2-5, extracción del Inserto digerido con Nde1 y Xho1 desde las colonias 1,2,3,4. Carril 6, extracción de pET-29 b (+) digerido con Nde1 y Xho1.

4.2.7. Clonación en el vector de expresión pET-29 b (+)

El inserto liberado (612 pb) fue ligado al vector pET-29 b (+) pre-digerido con las enzimas de restricción NdeI y XhoI. La mezcla de la ligación se empleó para transformar la cepa bacteriana *E. coli* XL2 blue y a continuación se realizó la PCR usando los cebadores del inserto pET-HcF y pET-HcR (con 8 colonias), de las cuales se obtuvieron 7 positivas con la banda de 612 pb (Figura 4. 2.16).

Se eligieron las colonias que presentaron mayor pureza en la amplificación, 4 colonias al azar (colonias 2,3,6 y 8). Se realizaron miniprep con las colonias positivas y se secuenciaron los plásmidos obtenidos. Las enzimas de restricción fueron seleccionadas tras comprobar mediante el programa informático “Gene Runner” la ausencia de las dianas en la secuencia del fragmento amplificado. El producto de PCR obtenido fue analizado y se observó una sola banda cuyo peso molecular coincidió con el esperado (612 pb). Tras comparar la secuencia se procedió a la expresión de la proteína recombinante.

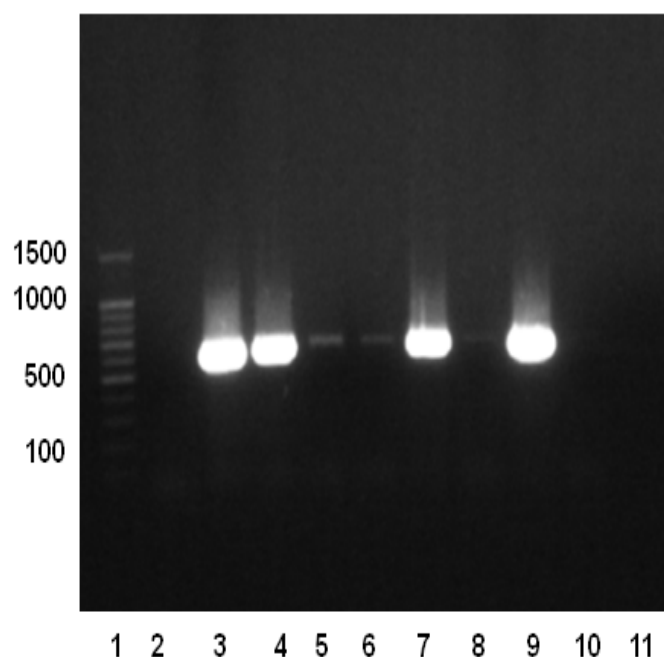


Figura 4.2.16. Carril 1, marcador en peso molecular en pb. Carriles 2-9, PCR colonias de *E. coli* XL2 blue transformadas con el inserto clonado en el vector pET-29 b (+), usando los cebadores pET-HcF y pET-HcR (más de 600 pb). Carriles 10-11, control negativo.

4.2.8. Expresión de rHc23

La expresión de la proteína recombinante rHc23 en condiciones nativas se llevó a cabo mediante cultivos de la bacteria de expresión *E. coli* Bl 21. Inicialmente se realizó un cultivo pequeño para determinar la expresión a distintas concentraciones del inductor IPTG (0, 0.5, 2 y 4 mM) y a distintos tiempos de inducción (2 y 4 h). Los cultivos se incubaron a 37 °C con agitación. Las muestras se analizaron mediante geles de acrilamida y se comprobó que la concentración con 0.5 mM de IPTG durante 2 horas era capaz de permitir la expresión de la proteína con la misma intensidad que con las concentraciones superiores del IPTG (Figura 4.2.17).

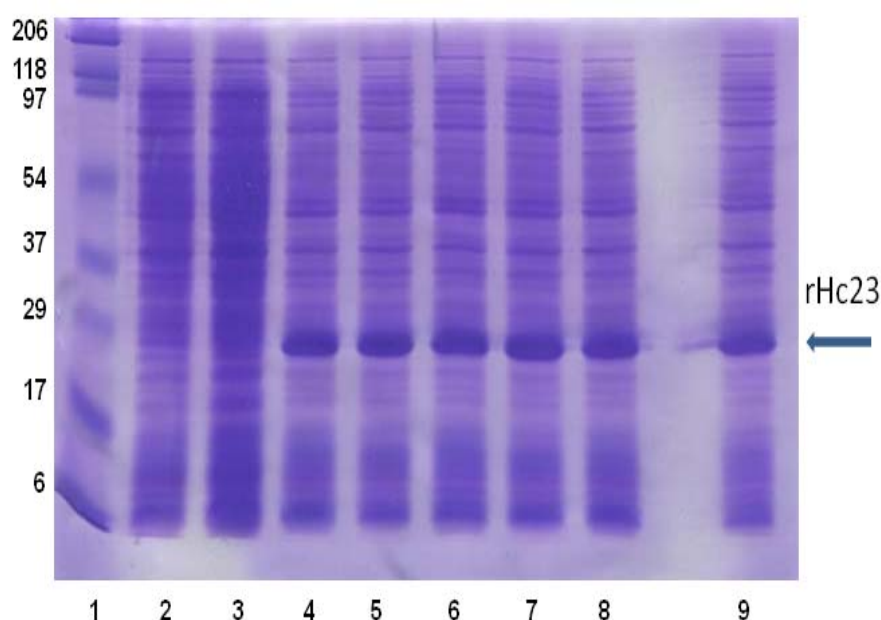


Figura 4.2.17. Análisis de expresión de rHc23 a diferentes concentraciones de IPTG. Carril 1, marcador de peso molecular en kDa. Carriles 2 y 3, cultivo no inducido después 2 y 4 h. Carriles 4 y 5, cultivo inducido con 0.5 mM de IPTG después 2 y 4 h. Carriles 6 y 7, cultivo inducido con 2 mM de IPTG después 2 y 4 h. Carriles 8 y 9, cultivo inducido con 4 mM de IPTG después 2 y 4 h.

4.2.9. Solubilización de rHc23

La proteína se solubilizó usando el tampón I (20 mM TRIS –HCl pH 8, NaCl 0,5 M, Imidazol 5 mM, β ME 10 mM y una pastilla de inhibidores de proteasas (complete mini EDTA free de Roche). Se determinaron las condiciones de solubilización más idóneas para la proteína (con o sin detergentes); para ello, el

sedimento obtenido tras la inducción fue resuspendido bien en el tampón I, o en el mismo tampón con 0.3% sarcosyl o en el mismo tampón más 0.5% Tween 20; después las 3 muestras fueron sometidas a sonicación (10 ciclos de un 1 min con una pausa de 1 min entre ciclos) y se centrifugaron a 13000 rpm, a 4 °C durante 1 hora. Los mejores resultados se obtuvieron utilizando como detergente sarcosyl, y la mayor cantidad de proteína se detectó en el sobrenadante (Figura 4.2.18).

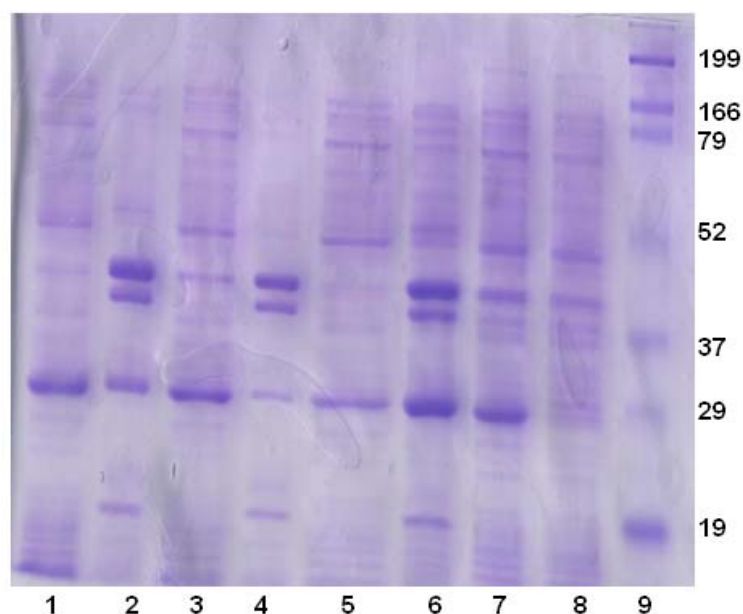


Figura 4.2.18. Análisis electroforético (SDS-PAGE) de la solubilización de rHc23 teñidas con azul de coomassie. Carril 1, sobrenadante usando 0.5% Tween 20. Carril 2, sedimento usando 0.5% Tween 20. Carril 3, sobrenadante usando 0.3% sarcosyl. Carril 4, sedimento de sonificado 0.3% sarcosyl. Carril 5, sobrenadante sin detergente. Carril 6, sedimento sin detergente. Carril 7, cultivo inducido. Carril 8, cultivo no inducido. Carril 9, marcador de peso molecular en KDa.

Dado que habíamos obtenido buenos resultados con la concentración del 0.3% de sarcosyl, repetimos el procedimiento pero a concentraciones inferiores del detergente (0.3%, 0.15% y 0.05%), obteniendo los mejores resultados cuando se utilizó el sarcosyl al 0.15% (Figura 4.2.19).

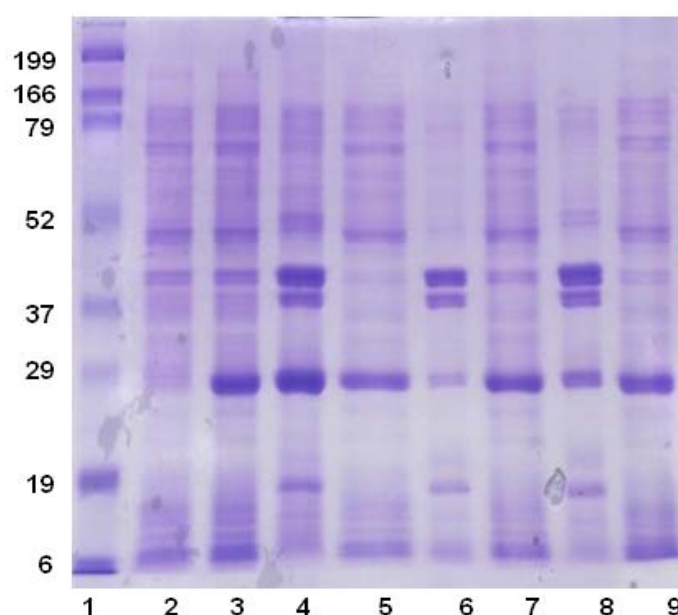


Figura 4.2.19. Análisis electroforético (SDS-PAGE) de la solubilización de rHc23 teñidas con azul de coomassie. Carril 1, marcador de peso molecular en KDa. Carril 2, cultivo no inducido. Carril 3, cultivo inducido. Carril 4, sedimento con 0.3% sarcosyl. Carril 5, sobrenadante con 0.3% sarcosyl. Carril 6, sedimento con 0.15% sarcosyl. Carril 7, sobrenadante con 0.15% sarcosyl. Carril 8, sedimento con 0.05% sarcosyl. Carril 9, sobrenadante con 0.05% sarcosyl.

4.2.10. Purificación de rHc23

Se realizó un cultivo de 500 mL para obtener suficiente cantidad de proteína para la prueba de vacunación, la proteína recombinante Hc23 era portadora de una cola de 6 histidinas en el extremo aminoacídico, lo que permitía su fácil purificación mediante el empleo de resinas de Ni-NTA.

La purificación se consiguió mediante diferentes lavados de la resina de la columna usando tampones con concentración crecientes de imidazol. Las fracciones recogidas fueron analizadas en gel de acrilamida, comprobando que la proteína se unía completamente a la resina. Para la elución se utilizó imidazol con concentraciones de 100 y 250 mM, que aseguraban la elución total de la proteína (Figuras 4.2.20 y 4.2.21).

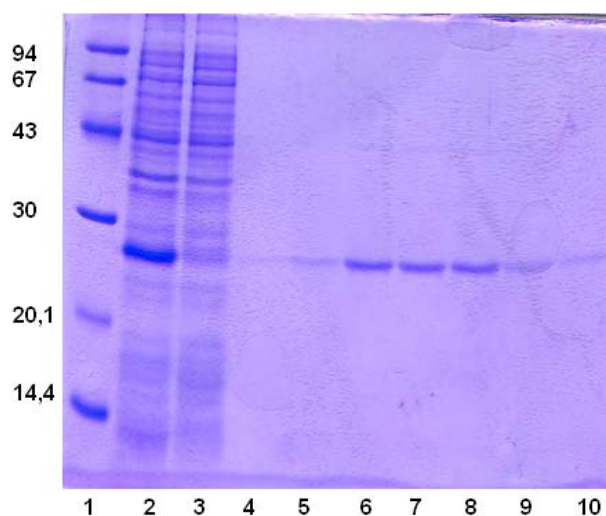


Figura 4.2.20. Análisis electroforético (SDS-PAGE) de las fracciones obtenidas en la purificación de rHc23 teñidas con azul de coomassie. Carril 1, marcador de peso molecular en KDa. Carril 2, sobrenadante obtenido por sonicación. Carril 3, fracción no unida. Carril 4, eluato con tampón de unión (BB). Carril 5, eluato con tampón de lavado1. Carril 6, eluato con tampón de lavado 3. Carriles 7 y 8, eluato con tampón de elución 1 (imidazol 100 mM). Carriles 9 y10, eluato con tampón de elución 2 (imidazol 250 mM).

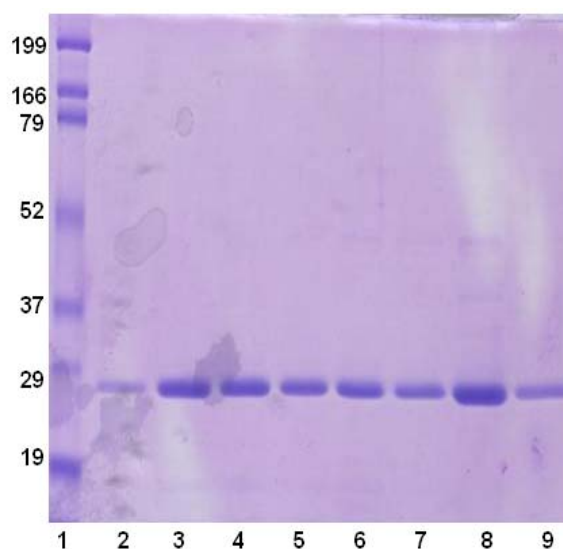


Figura 4.2.21. Análisis electroforético (SDS-PAGE) de las fracciones obtenidas en la purificación de rHc23 teñidas con azul de coomassie. Carril 1, marcador de peso molecular en KDa. Carril 2, eluato con lavado 2. Carril 3, eluato con lavado 3. Carriles 4-6, eluato con tampón de elución 1 (imidazol 100 mM). Carriles 7-9, eluato con tampón de elución 2 (imidazol 250 mM).

4.3. CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA Hc23

Se realizaron ensayos inmunológicos (WB) frente a ESA y rHc23 con sueros procedentes de ovejas inmunizadas con p26/23 nativa y su recombinante (experimentos anteriores) y suero de conejo hiperinmunizado frente a rHc23. Se observó el reconocimiento de dos bandas, una de 23 KDa (correspondiente a Hc23) y otra de aproximadamente 46 KDa; lo que demostraba la existencia de reactividad cruzada entre las proteínas nativa y recombinante y el ESA del parásito. Estos resultados apuntaban a que la proteína recombinante (rHc23) era la misma proteína que la nativa (Hc23). Tras la secuenciación se confirmó la identidad de ambas proteínas.

En la Figura 4.3.1 Se muestra el resultado de la inmunodetección, comprobándose el reconocimiento del antígeno de 23 KDa en todos los casos, y observándose el mismo patrón de inmunorreconocimientos con unos y otros sueros.

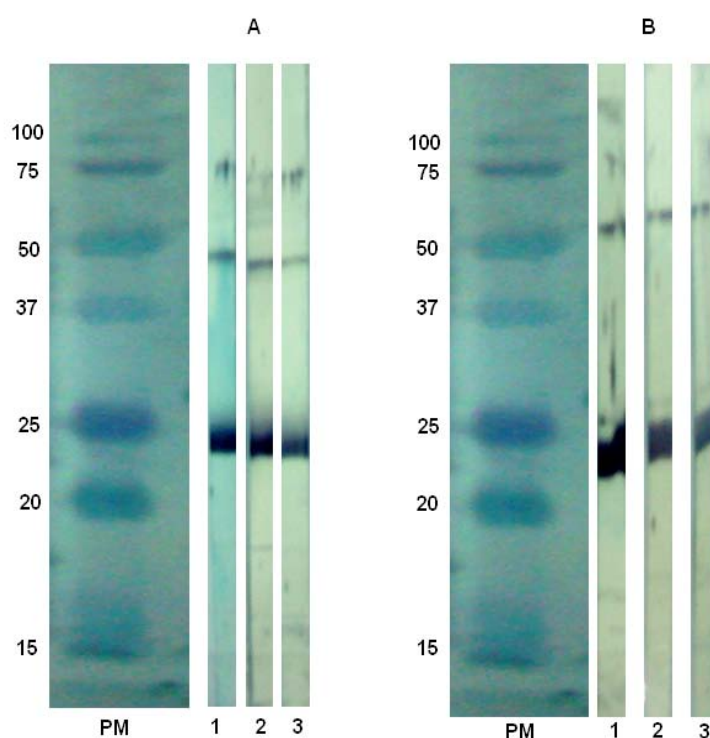


Figura 4.3.1. Inmunodetecciones realizadas con rHc23 (A) y ESA (B) enfrentadas a los sueros hiperinmunes de conejo obtenidos frente a rHc23 (1), sueros de ovejas vacunadas con p26/23 (2) y con rHcp26/23 (3). A la izquierda se muestran los marcadores en PM en KDa.

(<http://bioinformatics.picr.man.ac.uk/research/software/tools /sequenceconverter.html>).

Figura 4.3.2. Secuencia aminoacídica completa de la proteína Hc23.

La proteína fue extraída del gel y empleada para determinar la identidad de las proteínas nativa y recombinante mediante espectrometría de masas. Las bandas proteicas fueron digeridas con tripsina. Los resultados, con Mascot Research Enghien, mostraron que la proteína mayoritaria tenía un PM de 23 KDa [Hc23] (tanto la forma nativa como la recombinante). Se observó una segunda banda de 46 KDa que como ya hemos indicado corresponde a un dímero de Hc23.

de fosforilación de las distintas enzimas (cAMP y cGMP quinasa, de la quinasa C, la tirosina quinasa o de la caseína quinasa II, entre otras).

La secuencia obtenida contenía un total de 612 pb que codificaban 204 aminoácidos [programa informático ProtParam tool (<http://us.expasy.org/cgi-bin/protparam>)]. La composición de aminoácidos deducida de la proteína Hc23 se muestra en la Figura 4.3.3. El aminoácido N-terminal de la secuencia fue M (Met) lo que indicaba que la Proteína estaba completa y su vida media estimada fue de alrededor de 30 horas en reticulocitos de mamíferos, *in vitro*; > 20 horas (levaduras, *in vivo*) y > 10 horas (*E. coli*, *in vivo*). El número total de residuos con carga negativa (Asp + Glu) fue de 35 y el número total de residuos con carga positiva (Arg + Lys) de 33. La composición atómica de la secuencia fue C1073H1709N305O315S4 (nº total de átomos = 3406) y el punto isoeléctrico (pI) fue 6.71. Además este programa permitió calcular el índice alifático (84.69) y el índice de inestabilidad (45.91). Su valor sugería que la proteína era inestable.

Ala (A)	23	11.3%
Arg (R)	8	3.9%
Asn (N)	7	3.4%
Asp (D)	14	6.9%
Cys (C)	2	1.0%
Gln (Q)	8	3.9%
Glu (E)	20	9.9%
Gly (G)	5	2.5%
His (H)	8	3.9%
Ile (I)	11	5.4%
Leu (L)	19	9.4%
Lys (K)	25	12.3%
Met (M)	2	1.0%
Phe (F)	6	3.0%
Pro (P)	13	6.4%
Ser (S)	7	3.4%
Thr (T)	8	3.9%
Trp (W)	2	1.0%
Tyr (Y)	3	1.5%
Val (V)	12	5.9%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%

Figura 4.3.3. Composición aminoacídica de Hc23 de *H. contortus*.

Se llevaron a cabo búsquedas en NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) para hallar homologías entre la secuencia Hc23 y otras de nematodos como se muestra en las tablas 4. C y D, se apreciaron homologías entre las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos de Hc23 y las de algunos nematodos, especialmente *Caenorhabditis* spp. estos hallazgos apuntan al hecho de que la proteína estaba muy conservada en los nematodos, aunque no fue posible determinar ni su identificación ni su función.

Tabla 4.C. Comparación de la secuencia de aminoácidos de Hc23 de *H. contortus* con otras proteínas de nematodos. % identidad: aminoácidos idénticos. % semejanza: aminoácidos idénticos + aminoácidos de características funcionales similares. (*)

Especie (Proteínas)	% identidad	% semejanza
<i>Caenorhabditis brenneri</i> Proteína hipotética CAEBREN_05254	49%	68%
<i>Caenorhabditis briggsae</i> Proteína CBR-ORA-1	46%	69%
<i>Onchocerca</i> Proteína ORA-1	46%	68%
<i>Caenorhabditis remanei</i> Proteína CRE-ORA-1	46%	68%
<i>Caenorhabditis brenneri</i> Proteína CBN-ORA-1	45%	69%
<i>Caenorhabditis brenneri</i> Proteína hipotética CAEBREN_31722	45%	69%
<i>Caenorhabditis remanei</i> Proteína hipotética CRE_10152	43%	64%
<i>Caenorhabditis elegans</i> Proteína hipotética F57H126	43%	64%
<i>Caenorhabditis briggsae</i> Proteína hipotética CBG17730	43%	64%

(*) Basado en datos de BLASTP

Tabla 4.D. Comparación de la secuencia de nucleótidos de Hc23 de *H. contortus* con otras proteínas de nematodos. % identidad: nucleótidos idénticos. % semejanza: nucleótidos idénticos. (*)

Especie (Nucleótidos)	% identidad	% semejanza
<i>Caenorhabditis remanei</i> Proteína CRE-ORA-1	22%	74%
<i>Caenorhabditis remanei</i> Proteína hipotética (CRE_10152)	17%	74%
<i>Caenorhabditis briggsae</i> Proteína hipotética CBG17730	17%	70%
<i>Caenorhabditis briggsae</i> Cosmid G14F09	17%	70%

(*) Basado en datos de BLASTN

El análisis de la estructura secundaria de la proteína con el programa TMHMM2 mostró la existencia de una región trans-membrana (los primeros 20 aa) que aparecen como un pico hidrofóbico (picos negativos). Los picos positivos (resto de la secuencia) presentaban regiones muy hidrofílicas que predecían la antigenicidad más elevada de la proteína (Figura 4.3.4). El análisis de la estructura de la proteína con NCBI-Blast mostró un dominio de función desconocida DUF148 (95–195 aa). Este dominio no presentaba una función conocida y por tanto, tampoco ninguna de las proteínas que lo poseen (Figura 4.3.5).

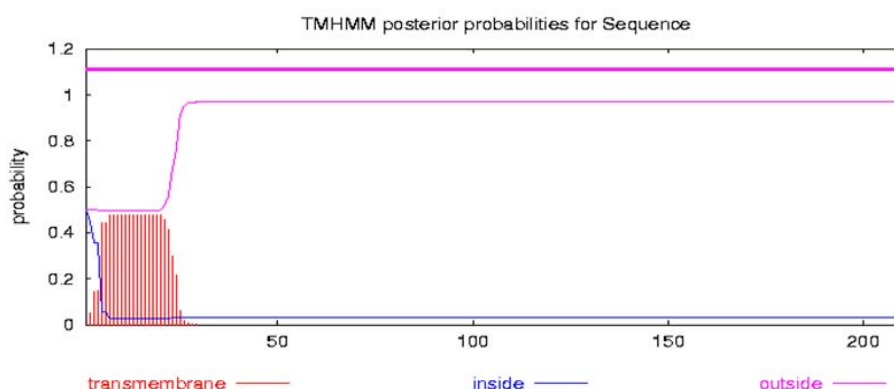


Figura 4.3.4. Presenta una región transmembrana (los primeros 20 aa) deducida por el programa TMHMM2.

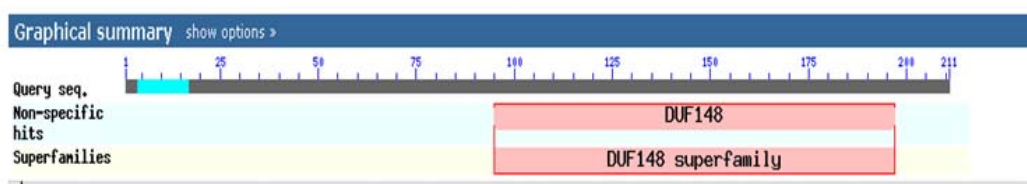


Figura 4.3.5. Presenta un dominio de función desconocida Pfam-DUF148 (95 – 195 aa) deducida por BLASTP.

4.4. ENSAYO VACUNAL

4.4.1. Eliminación fecal de huevos

La dinámica correspondientes a la eliminación fecal de huevos (hpg) de los grupos infestados durante el ensayo vacunal, se presenta en las Figuras 4.4.1- 4.4.4 y en el tabla 4.E. El sumatorio de los valores obtenidos desde que comenzó la patencia de la infestación hasta el final del ensayo mostró diferencias significativas en los grupos vacunados con Hc23 nativa y con la proteína recombinante (GI, GII, GIII y GIV) y el grupo infestado y reinfestado (GVII), respecto al grupo primoinfestado (GVI) con un valor de $p < 0.001$. Los grupos vacunados (GI, GII, GIII y GIV) alcanzaron su pico máximo de eliminación fecal de huevos con – 2507 hpg en GI, 1495 hpg en GII, 1600 hpg en GIII y 1236 hpg en GIV, 1000 hpg en el grupo infestado y reinfestado (GVII), durante la cuarta semana post-infestación (PI), mientras que el grupo primoinfestado (GVI) alcanzó un máximo de 10100 hpg en el día 24 PI. El grupo control (GV) no mostró eliminación fecal de huevos en ningún momento del periodo experimental.

Cuando comparamos el grupo primoinfestado de (GVI) con el grupo infestado y reinfestado (GVII) comprobamos que los animales que fueron infestados con 10000 L3 por primera vez (GVII) comenzaron su eliminación fecal de huevos entre los días 16 a 21 PI, de igual forma que en el grupo primoinfestado (GVI) con el reto de 15000 L3. El grupo VII alcanzó durante la primera infestación un máximo de 10171 hpg, en el día 28 PI, valor similar al obtenido por (mientras que en) el grupo GVI. En efecto, se obtuvieron recuentos de hpg muy similares entre ambos grupos, a pesar de que las dosis infestantes fueron diferentes, lo que posiblemente pudiera ser debido al incremento de la deposición fecal, relacionada con la edad, durante la dosis de prueba, con la consiguiente dilución de las formas parasitarias en los corderos de mayor edad.

Los periodos de prepatencia de las infestaciones con *H. contortus* fueron muy variables en los distintos grupos experimentales. En el grupo primoinfectado (GVI) fue más corto, de 18 días PI, similar al observado en el grupo GVII durante su primera infestación. Sin embargo, los grupos vacunados en comparación con el grupo primoinfectado (GVI) mostraron un alargamiento significativo de la prepatencia con un valor $p < 0.05$ en el día 24. En los grupos vacunados hubo animales que iniciaron la eliminación de huevos del parásito en el día 28 PI, como el animal n° 11 (GII) y n° 28 (GIV).

La inmunización con Hc23 (nativa y recombinante) indujo por tanto un alargamiento del periodo prepatente de la infestación; así como reducciones en la eliminación fecal de huevos (57% en GI, 74% en GII, 79% en GIII y GIV). Resultados similares fueron apreciados en el grupo infestado y reinfestado que mostró un alargamiento del periodo prepatente de la infestación, así como reducciones en la eliminación fecal de huevos $> 85\%$ en comparación con el grupo primoinfectado (GVI).

Los análisis efectuados los días 24, 28, 35 y 42 PI mostraron diferencias significativas con una menor eliminación de huevos en los grupos vacunados y grupo infestado y reinfestado respecto el grupo primoinfectado. Todos los grupos vacunados mostraron variaciones estadísticamente significativas en los días 24 y 28 PI, así como en el día 35, donde el grupo GI mostró una significación de $p < 0.05$, y el resto de los grupos vacunados con $p < 0.01$; además los grupos GII y GIV mostraron diferencias significativas de $p < 0.01$ en el día 21 PI. Por su parte, el GI no mostró significación en el día 42 PI con un valor de $p > 0.05$, pero sí, los otros grupos vacunados con un valor de $p < 0.05$ en el GII y una $p < 0.01$ para GIII y GIV.

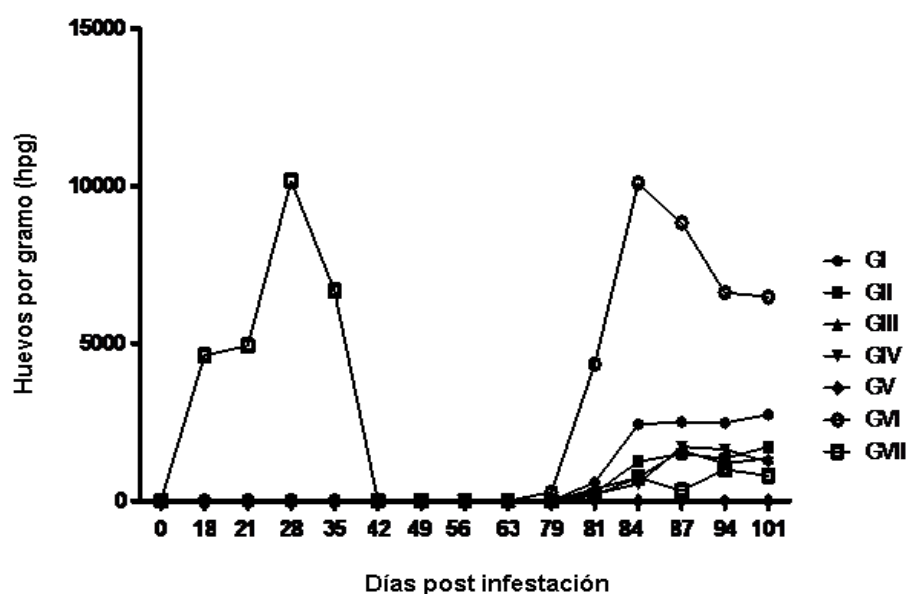


Figura 4.4.1. Eliminación fecal de huevos de *H. contortus* en los 7 grupos durante el ensayo.

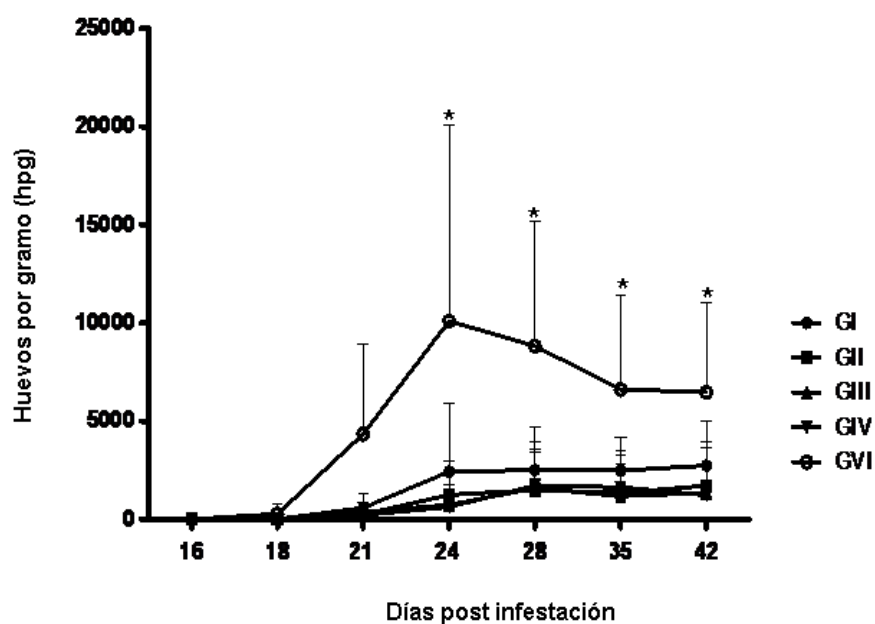


Figura 4.4.2. Eliminación fecal de huevos de *H. contortus* en los 5 grupos (4 grupos vacunados GI, GII, GIII y GIV) y grupo primoinfectado (GVI) durante el ensayo. *: Diferencias estadísticamente significativas.

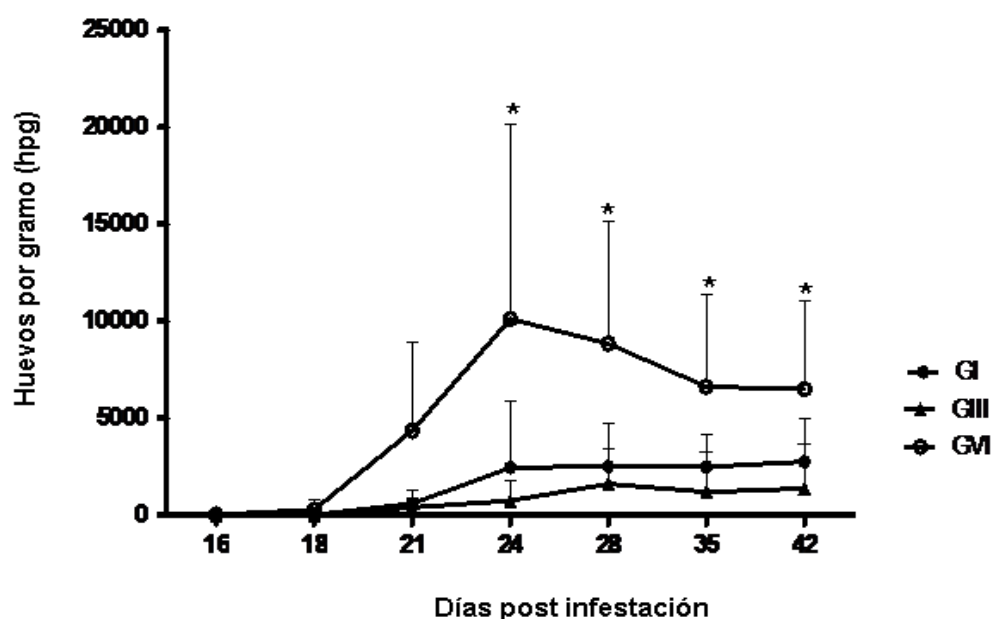


Figura 4.4.3. Eliminación fecal de huevos de *H. contortus* en los 2 grupos vacunados con Hc23 (GI + $\text{Al}(\text{OH})_3$) y (GIII + lipopolisacáridos de *E. coli* y *Propionibacterium* spp.) y el grupo primoinfectado (GVI) durante el ensayo. *: Diferencias estadísticamente significativas.

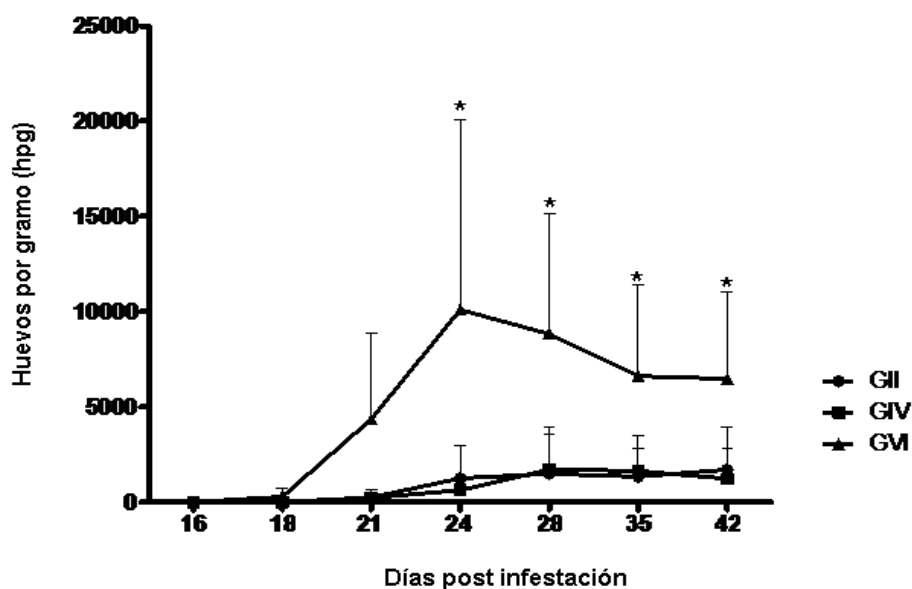


Figura 4.4.4. Eliminación fecal de huevos de *H. contortus* en los 2 grupos vacunados con rHc23 (GII + $\text{Al}(\text{OH})_3$) y (GIV + lipopolisacáridos de *E. coli* y *Propionibacterium* spp.) y grupo primoinfectado (GVI) durante el ensayo. *: Diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 4.E. Número de huevos por gramo en la heces durante la patencia en los 7 grupos, expresados como $\sqrt{\text{Media} \pm \text{desviación estándar}}$.

Grupos	Animales	16 día PI	18 día PI	21 día PI	24 día PI	28 día PI	35 día PI	42 día PI
GI	1	0	0	14.1	45.3	33.9	41.2	35.4
	2	0	0	10.0	41.8	57.0	56.6	76.8
	3	0	0	12.2	22.4	36.1	36.7	25.5
	4	0	0	28.3	100.7	84.3	76.8	68.9
	5	0	0	7.1	18.7	29.2	29.2	17.3
	6	0	0	29.2	37.4	47.4	51.0	43.0
	7	0	0	44.2	29.2	40.6	41.8	67.1
	M \pm DS	0	0	20.7 \pm 13.50	42.2 \pm 27.6	46.9 \pm 18.8	47.6 \pm 15.7	47.7 \pm 23.3
GII	8	0	0	0	20.0	24.5	26.5	30.0
	9	0	0	10	25.5	14.1	29.2	25.5
	10	0	0	7.07	17.3	28.3	28.3	30.8
	11	0	0	0	0.0	3.9	14.1	7.1
	12	0	0	28.3	58.3	60.0	43.0	65.6
	13	0	0	28.3	63.2	71.8	67.5	71.4
	14	0	0	0	0	10.0	21.2	7.1
	M \pm DS	0	0	10.5 \pm 12.7	26.3 \pm 25.47	30.3 \pm 25.8	32.8 \pm 17.6	33.9 \pm 25.6
GIII	15	0	0	7.1	18.7	17.3	10.0	5.5
	16	0	0	29.2	53.9	72.5	75.5	80.3
	17	0	0	0	10	12.2	7.1	0
	18	0	0	0	14.1	32.4	22.4	31.6
	19	0	0	35.4	36.7	40.6	39.4	30.8
	20	0	0	21.2	14.1	50.5	18.7	30.8
	21	0	0	7.1	7.1	15.8	7.1	12.2
	M \pm DS	0	0	14.3 \pm 14.9	22.1 \pm 16.9	34.4 \pm 21.9	25.7 \pm 24.7	27.3 \pm 26.7

Tabla 4.E. Número de huevos por gramo en la heces durante la patencia en los 7 grupos, expresados como $\sqrt{\text{Media} \pm \text{desviación estándar}}$.

Grupos	Animales	16 día PI	18 día PI	21 día PI	24 día PI	28 día PI	35 día PI	42 día PI
GIV	22	0	0	35.4	46.9	75.5	70.7	66.0
	23	0	0	0	15.8	5.5	3.9	0.0
	24	0	0	0	3.9	7.1	7.1	7.1
	25	0	0	14.1	29.2	68.2	63.6	52.0
	26	0	0	12.2	21.2	38.7	34.6	33.2
	27	0	0	0	3.9	7.1	30.0	18.7
	28	0	0	0	0	10	15.8	10
	M \pm DS	0	0	8.8 \pm 13.2	17.2 \pm 16.8	30.2 \pm 30.7	32.2 \pm 26.4	26.6 \pm 24.7
GVI	35	0	0	29.2	59.6	67.8	60.8	50.5
	36	0	0	59.2	86.6	90.8	80.9	114.5
	37	0	36.74	83.1	168.2	132.7	96.2	93.3
	38	0	12.25	113.1	136.7	113.6	91.1	83.1
	39	0	17.32	75.2	97.2	120.8	122.7	102.7
	40	0	12.25	22.4	45.3	48.0	45.8	49.5
	41	0	0	15.8	33.9	39.4	36.7	33.2
	M \pm DS	0	11.2 \pm 13.3	56.8 \pm 36.1	89.6 \pm 49.1	87.6 \pm 36.7	76.3 \pm 30.3	75.2 \pm 30.8
GVII	42	0	0	0	0	0	36.1	42.4
	43	0	0	10	15.8	12.2	12.2	0
	44	0	0	31.6	67.5	40.6	62.4	50
	45	0	0	0	10	12.2	38.7	32.4
	46	0	0	0	0	0	0	0
	47	0	0	10	15.8	14.1	10	0
	48	0	0	7.1	10	12.2	7.1	14.1
	M \pm DS	0	0	8.4 \pm 11.2	17.0 \pm 23.1	13.1 \pm 13.5	23.8 \pm 22.5	19.9 \pm 21.5

4.4.2. Carga parasitaria

La cuantificación total de parásitos encontrados en los abomasos de los diferentes grupos estudiados se indica en la tabla 4.F y en la Figura 4.4.5. Los grupos vacunados mostraron una carga parasitaria inferior; por su parte, el grupo GI evidenció un mayor número de adultos (318 ± 385) en comparación con los otros grupos vacunados (GII 147 ± 203 , GIII 127 ± 127 , GIV 131 ± 190) y respecto al grupo primoinfectado (GVI 1030 ± 383). El grupo infestado y reinfestado mostró una menor carga parasitaria al final del ensayo GVII 104 ± 179 .

Los recuentos de los adultos exhibieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos vacunados ($p < 0.05$ para GI y $p < 0.01$ para los grupos GII, GIII y GIV) con una reducción del 69% en GI, y $> 85\%$ en GII, GIII y GIV en comparación con el grupo primoinfectado, que presentaba los mayores recuentos de adultos, excepto el animal n° 35. Por su parte, en el grupo infestado y reinfestado mostró una disminución en los recuentos de adultos $> 85\%$ en comparación con el grupo primoinfectado.

En todos los grupos el número de hembras recuperadas fue variable y superior al número de machos. El valor más alto lo mostró la oveja 39 (GVI) con 4.78 hembras por cada macho presente, mientras que la oveja 3 (GI) presentó el menor número de hembras por cada macho (0.33). Hubo un animal (n°15 - GIII) en el que no se encontraron hembras de *H. contortus* en el abomaso, así como animales en los que no se detectaron machos (n° 5 - GI, 9 - GII, 17 - GIII y 21 - GIV). Finalmente, algunos animales no evidenciaron adultos en sus abomaso [n° 11 y 14 (GII) 23 y 28 (GIV) 43, 46 y 47 (GVII)].

Los datos referentes a helmintos totales, números de machos y hembras, junto con los valores de hpg totales se muestran en la Figura 4.4.6; con coeficientes de correlación positivos ($r = 0.85$, $p < 0.0001$), lo que implica que los animales con mayores recuentos de huevos presentaron a su vez la mayor carga parasitaria al final de ensayo. El grupo control (GV) no mostró helmintos al final del ensayo.

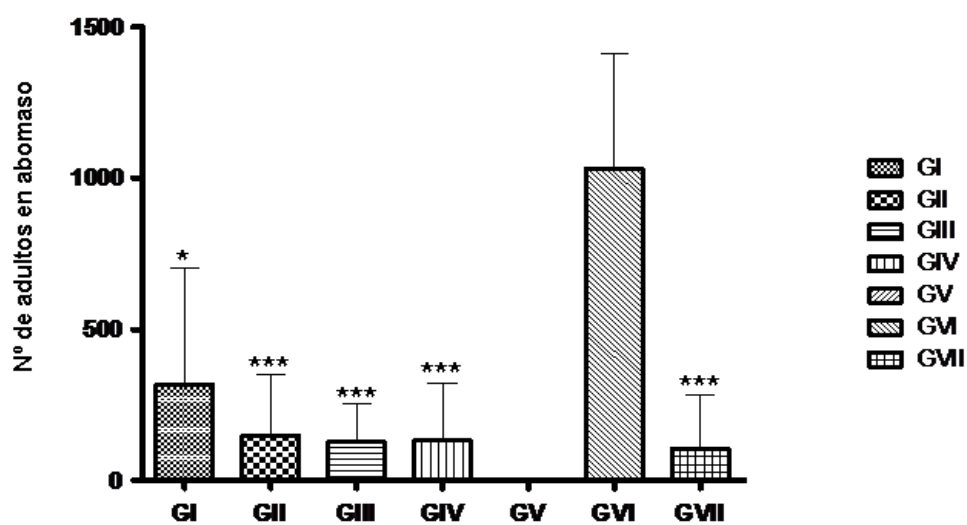


Figura 4.4.5. Los recuentos de adultos en el abomaso de los 7 grupos al final del experimento. *: Diferencias estadísticamente significativas.

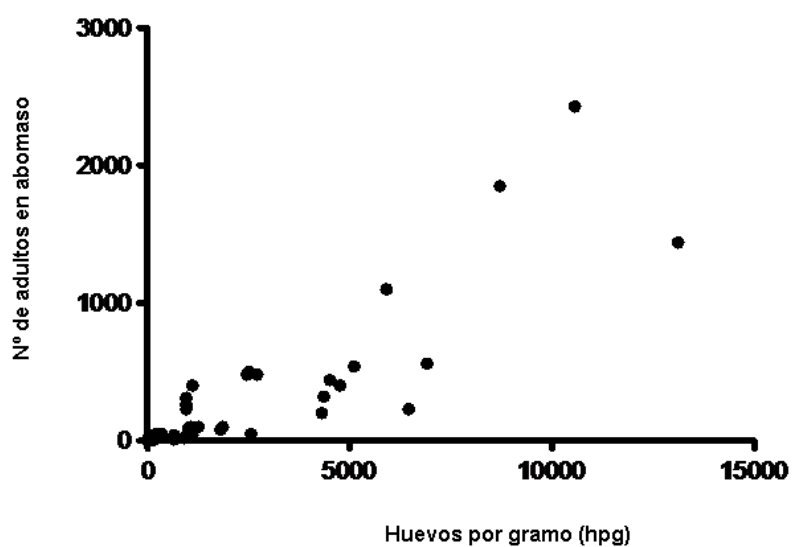


Figura 4.4.6. Correlación entre los parámetros de hpg y adultos recuperados en el abomaso de los grupos GI, GII, GIII, GIV, GVI y GVII.

Tabla 4.F. Número de helmintos adultos (machos, hembras y total) recogidos de abomaso en los 7 grupos, expresados como $\sqrt{}$. Media \pm desviación estándar.

Grupo	Nº Animal	Hembras	Machos	Adultos
GI	1	7.75	6.32	10.00
	2	25.50	21.21	33.17
	3	3.16	5.48	6.32
	4	17.03	10.49	20.00
	5	5.48	0	5.48
	6	8.37	5.48	10.00
	7	15.81	13.78	20.98
	M \pm DS	11.87 \pm 7.98	8.97 \pm 6.92	15.13 \pm 10.05
GII	8	3.16	3.16	4.47
	9	3.16	0	3.16
	10	15.17	5.48	16.12
	11	0	0	0
	12	11.40	8.37	14.14
	13	16.12	16.73	23.24
	14	0	0	0
	M \pm DS	7.00 \pm 7.03	4.82 \pm 6.16	8.73 \pm 9.09
GIII	15	0	3.16	3.16
	16	13.04	7.75	15.17
	17	3.16	0	3.16
	18	6.32	7.07	9.49
	19	14.83	9.49	17.61
	20	12.25	8.94	15.17
	21	3.16	0	3.16
	M \pm DS	7.54 \pm 5.81	5.20 \pm 4.09	9.56 \pm 6.46

Tabla 4.F. Número de helmintos adultos (machos, hembras y total) recogidos de abomaso en los 7 grupos, expresados como $\sqrt{}$. Media \pm desviación estándar.

Grupo	Nº Animal	Hembras	Machos	Adultos
GIV	22	4.69	11.83	17.89
	23	4.80	0	0
	24	4.90	4.47	5.48
	25	5.00	13.04	21.91
	26	5.10	3.16	6.32
	27	5.20	4.47	7.07
	28	5.29	0	0
	M \pm DS	5.00 \pm 0.22	5.28 \pm 5.24	8.38 \pm 8.45
GVI	35	5.92	5.48	7.07
	36	6.00	20.74	37.95
	37	6.08	24.70	43.01
	38	6.16	13.04	23.66
	39	6.24	20.49	49.30
	40	6.32	8.94	21.91
	41	6.40	10.49	20.00
	M \pm DS	6.16 \pm 0.18	14.84 \pm 7.17	28.99 \pm 17.88
GVII	42	8.37	3.16	8.94
	43	0	0	0
	44	19.49	10.95	22.36
	45	8.37	5.48	10.00
	46	0	0	0
	47	0	0	0
	48	4.47	5.48	7.07
	M \pm DS	5.81 \pm 7.11	3.58 \pm 4.09	6.91 \pm 8.12

4.4.3. Peso de los animales

Se realizó un seguimiento de la ganancia en peso de los animales a lo largo de todo el periodo experimental. Se pesaron individualmente a todos los animales de los siete grupos estudiados, en 3 momentos del experimento (-8, 0 y 8 semanas postinfestación). Los resultados aparecen en la Figura 4.4.7.

La mayor ganancia de peso se registró al final del experimento, con un aumento en todos los grupos, especialmente en el grupo control, con unos valores medios superiores a los determinados en otros grupos, excepto en el grupo primoinfectado

(GVI) que mostró una ligera disminución del peso vivo, aunque no fue estadísticamente significativa.

Al final del ensayo, el análisis de los datos medios indicaban unos incrementos de peso que oscilaron desde -3 Kg hasta +8.4 Kg (GI + 4.8 Kg, GII + 3.7 Kg, GIII + 2 Kg, GIV + 4.8 Kg, GV + 8.4 Kg, GVI - 3 Kg y GVII + 3 Kg). El análisis de la varianza con medidas repetidas no mostró un efecto significativo relacionado con el periodo experimental ni hubo una interacción significativa entre el tiempo y el peso de los animales ($p > 0.05$).

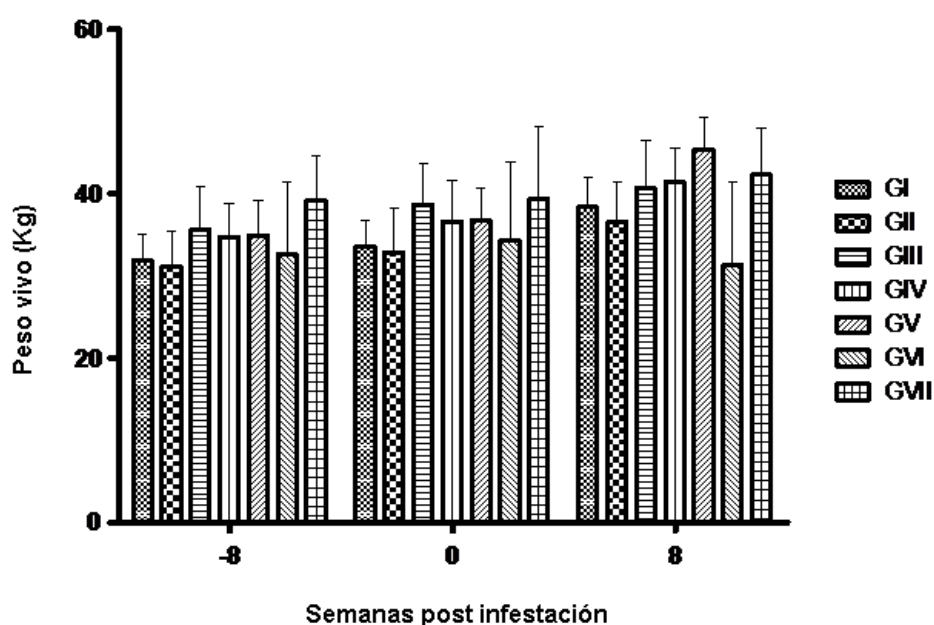


Figura 4.4.7. El peso vivo de los 7 grupos a lo largo del experimento.

4.4.4. Análisis hemáticos

4.4.4.A. Valor Hematocrito

La variación del valor hematocrito en los diferentes grupos aparece representada en las Figuras 4.4.8 - 4.4.11. El grupo control (GV) no infestado permaneció estable a lo largo del periodo experimental pero los demás grupos (todos ellos infestados con *H. contortus*) sufrieron una caída del hematocrito en el día 21 PI, mostrando valores de $Hto \leq 30$. Las determinaciones inferiores se observaron en el grupo GVI con un valor

del 19% en el día 35 PI. Al final del experimento (día 44 postinfestación) se apreció una ligera recuperación del hematocrito.

El análisis estadístico indicó diferencias muy significativas ($p < 0.001$) entre los grupos vacunados (GI, GII, GIII y GIV), y el grupo infestado y reinfestado (GVII) a lo largo del periodo del estudio, respecto al grupo primoinfestado (GVI).

Los análisis de los días postvacunación mostraron diferencias significativas entre los grupos experimentales en los días 21, 35 y 44 PI en los grupos vacunados y en el grupo infestado y reinfestado respecto al grupo primoinfestado (GVI) con un valor de $p < 0.01$.

En el grupo primoinfestado (GVI) se observó una disminución del nivel de hematocrito que se inició en la patencia y se mantuvo hasta el final del ensayo, siendo estadísticamente significativo con un valor de $p < 0.01$ respecto al grupo control (GV). En general, los valores del grupo testigo fueron superiores y se mantuvieron estables durante la prueba vacunal.

Los distintos grupos experimentales mostraron durante la prepatencia variaciones mínimas. Sin embargo se observó una disminución coincidente con el inicio de la patencia que alcanzó un máximo en el día 21 PI. Por su parte, los grupos vacunados a pesar de presentar menores porcentajes de disminución, no se diferenciaron estadísticamente de grupo control.

Los valores del hematocrito tuvieron una correlación inversa y muy significativa con los recuentos de huevos ($r = -0.82$, $p < 0.0001$) durante el ensayo como se muestra en la Figura 4.4.12, lo que indicaba que los animales con recuentos de huevos superiores presentaron una mayor disminución del nivel de hematocrito (como el observado en el grupo GVI).

En todos los grupos el valor del hematocrito fue variable. El valor más bajo lo mostraron los corderos nº 36 y 38 (GVI) con un 13%, por su parte, en los grupos vacunados los valores inferiores se detectaron en los corderos nº 2 y 7 (GI), 13 (GII) con un valor del 23%.

En el grupo infestado y reinfestado (GVII), el cordero n° 44 exhibió el valor más bajo durante la primera infestación (13%) y un 20% durante la reinfestación.

Todos los grupos vacunados (GI, GII, GIII y GIV), grupo control (GV) y grupo primoinfestado mostraron diferencias significativas ($p < 0.01$) en el día -14 PI respecto al grupo infestado y reinfestado (GVII) (durante su primera infestación).

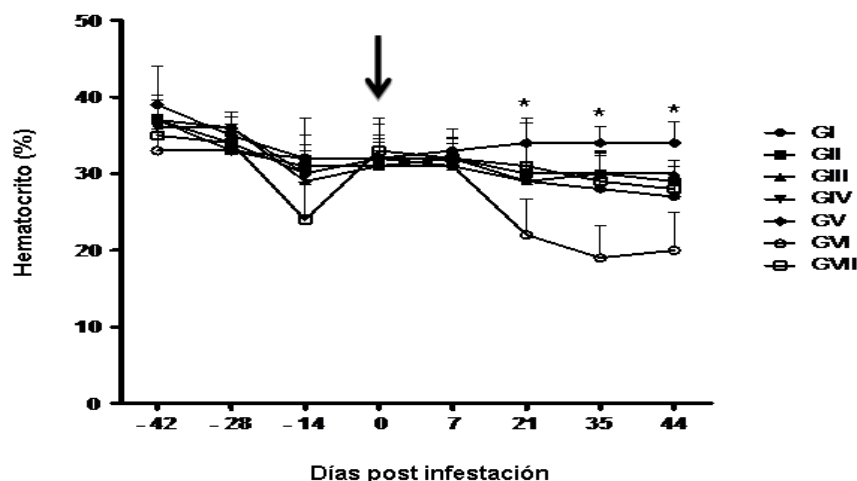


Figura 4.4.8. Valor hematocrito de los 7 grupos a lo largo del experimento. Marcado con una flecha el momento de la infestación. *: Diferencias estadísticamente significativas.

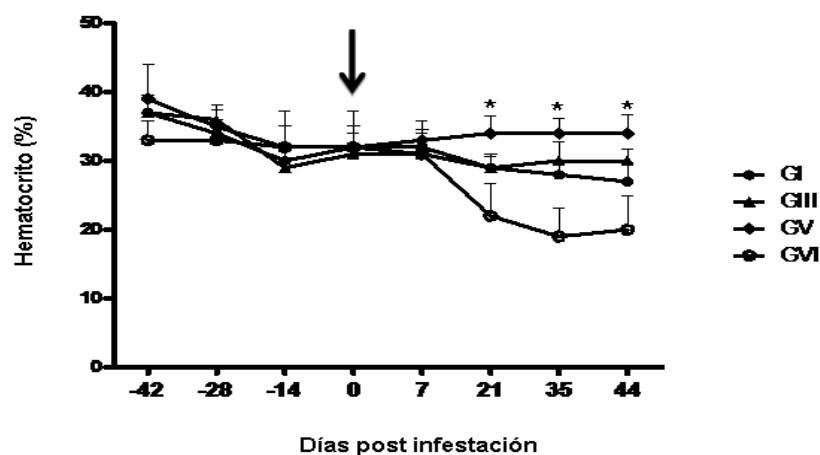


Figura 4.4.9. Valor Hematocrito de los 2 grupos vacunados con Hc23 (GI + Al OH₃) y (GIII + lipopolisacáridos de *E. coli* y *Propionibacterium* spp.), el grupo control (GV) y el grupo primoinfestado (GVI) a lo largo del experimento. Marcado con una flecha el momento de la infestación. *: Diferencias estadísticamente significativas.

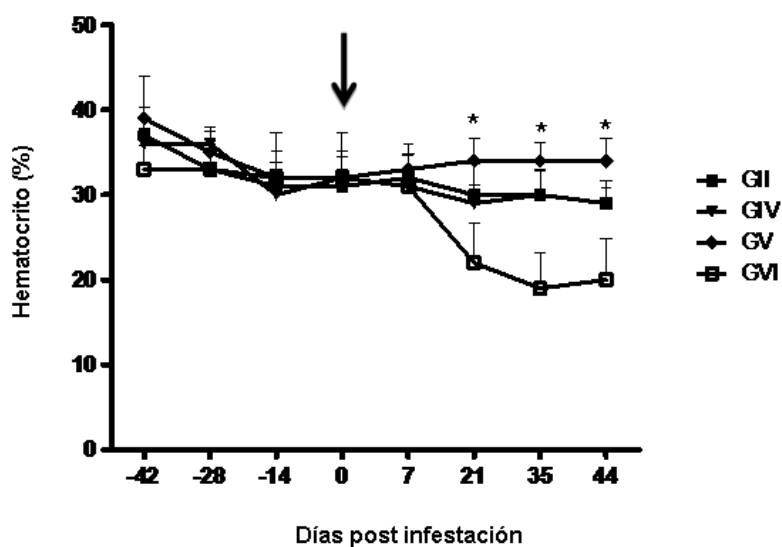


Figura 4.4.10. Valor Hematocrito de los 2 grupos vacunados con rHc23 (GII + Al OH₃) y (GIV + lipopolisacáridos de *E. coli* y *Propionibacterium* spp.), el grupo control (GV) y el grupo primoinfestado (GVI) a lo largo del experimento. Marcado con una flecha el momento de la infestación. *: Diferencias estadísticamente significativas.

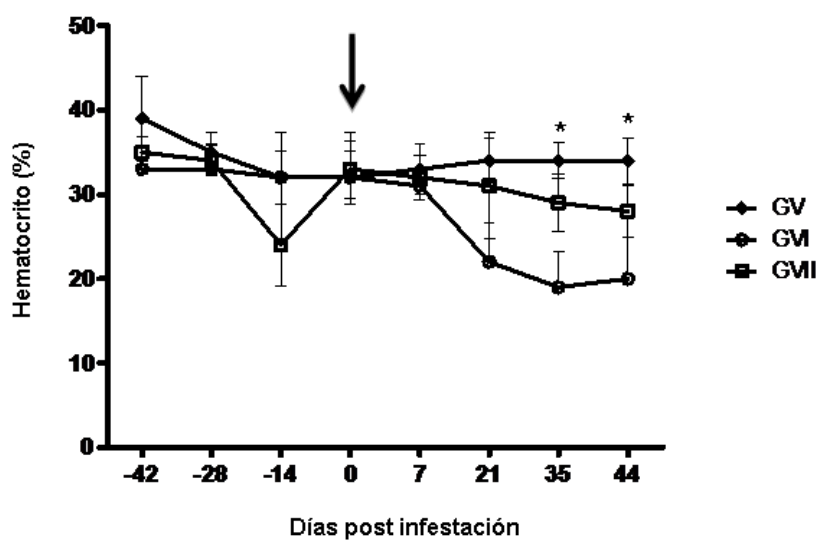


Figura 4.4.11. Valor hematocrito de los 3 grupos, el control (GV), primoinfestado (GVI) e infestado y reinfestado (GVII) a lo largo del experimento. Marcado con una flecha el momento de la infestación. *: Diferencias estadísticamente significativas.

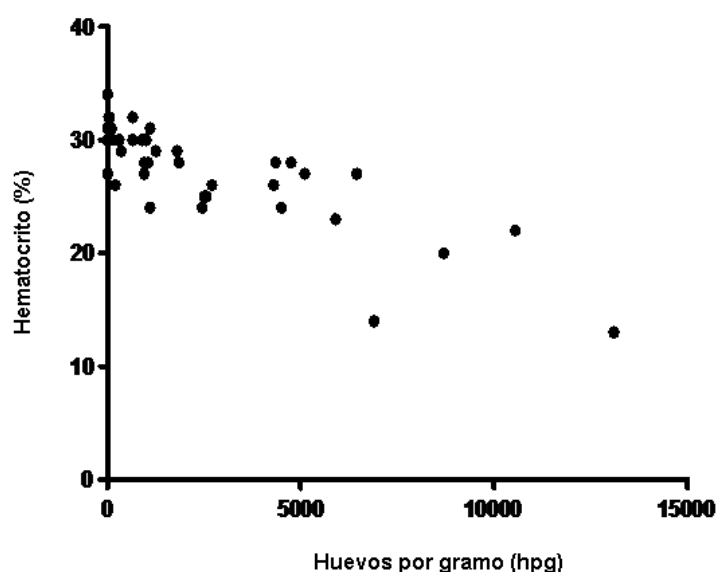


Figura 4.4.12. Correlación entre los parámetros de hpg y hematocrito de los grupos GI, GII, GIII, GIV, GVI y GVII.

4.4.4.B. Leucocitos

El análisis de la varianza con medidas repetidas no mostró ningún grado de significación en el recuento leucocitario de los distintos grupos ni en su relación entre el tiempo y los recuentos de glóbulos blancos, con una $p > 0.05$. Todos los grupos vacunados más el grupo infestado y reinfestado mostraron un ligero incremento en los recuentos en comparación con el grupo control, a la vez que se registró una disminución en los recuentos del grupo primoinfestado (aunque dentro de los márgenes fisiológicos) (Figuras 4.4.13 – 4.4.16).

Los grupos GI y GII mostraron un comportamiento similar en largo del ensayo con un incremento de sus valores desde el día -14 postinfestación, para alcanzar un máximo en el día 0 postinfestación, con valores medios para el grupo GI de 10.1×10^9 y para el grupo GII de 9×10^9 leucocitos/L, respectivamente.

Los grupos GIII y IV mostraron entre sí un comportamiento similar a lo largo del ensayo, con valores estables desde el principio; que para el grupo GIII oscilaron entre 8.4×10^9 y 8.7×10^9 y para el grupo GIV fueron de 7.3×10^9 a 8.0×10^9 leucocitos/L, respectivamente.

El grupo primoinfestado mostró un ligero descenso con un valor de 6.1×10^9 leucocitos/L. Por su parte, el grupo infestado y reinfestado evidenció también durante la primoinfestación una disminución con un valor de 6.5×10^9 leucocitos/L, para posteriormente con la reinfestación mostrar un ligero incremento (7.8×10^9 leucocitos/L). El patrón de los recuentos de glóbulos blancos fue dependiente de la eliminación fecal de huevos.

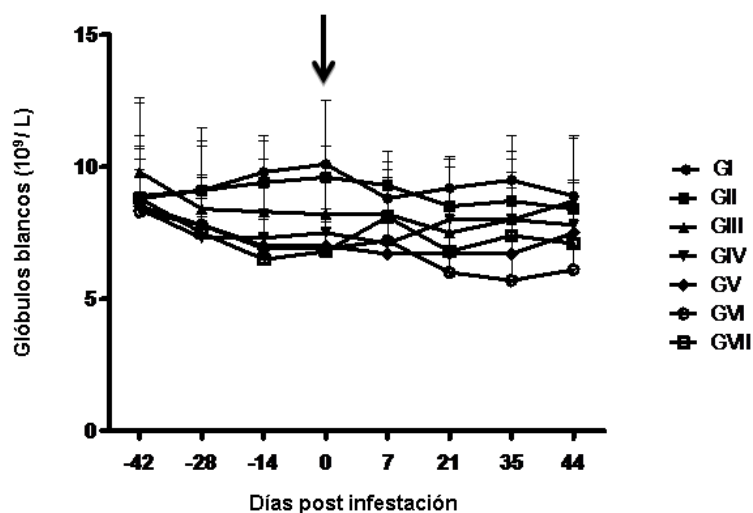


Figura 4.4.13. Los recuentos de los leucocitos de los 7 grupos a lo largo del experimento. Marcado con una flecha el momento de la infestación.

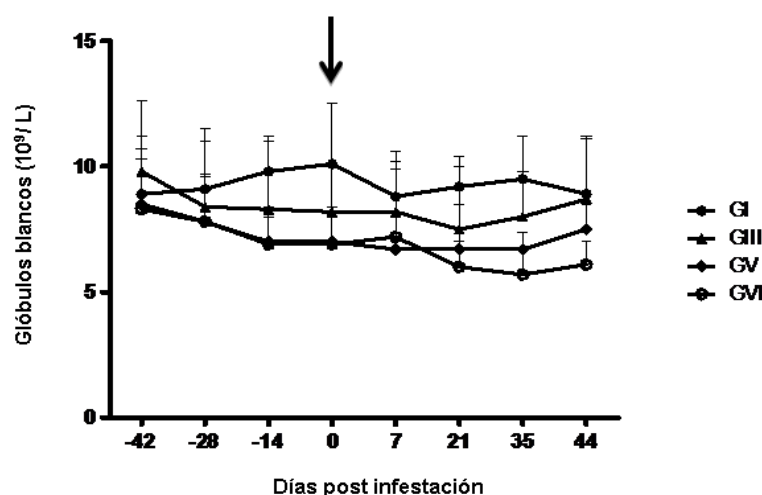


Figura 4.4.14. Los recuentos de los leucocitos los 2 grupos vacunados con Hc23 (GI + Al OH₃) y (GIII + lipopolisacáridos de *E. coli* y *Propionibacterium* spp.), el grupo control (GV) y el grupo primoinfestado (GVI) a lo largo del experimento. Marcado con una flecha el momento de la infestación.

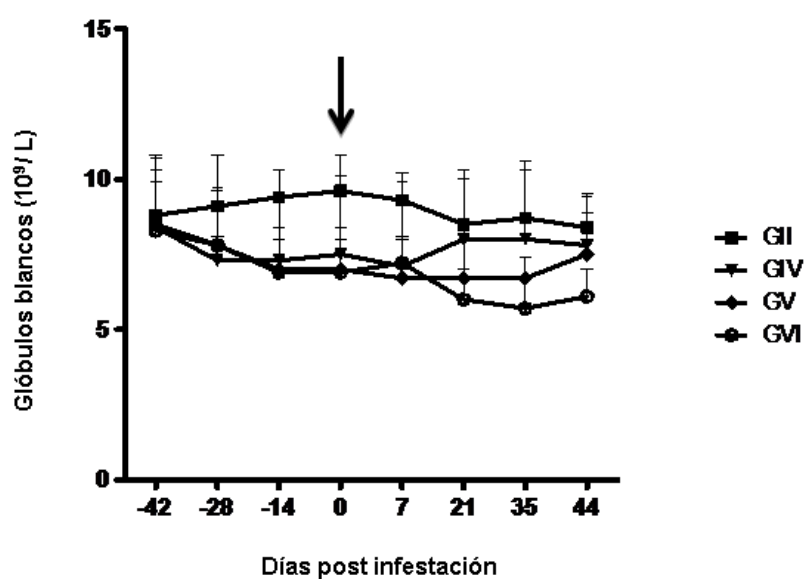


Figura 4.4.15. Los recuentos de los leucocitos de los 2 grupos vacunados con rHc23 (GII + Al OH₃) y (GIV + lipopolisacáridos de *E. coli* y *Propionibacterium* spp.), el grupo control (GV) y el grupo primoinfestado (GVI) a lo largo del experimento. Marcado con una flecha el momento de la infestación.

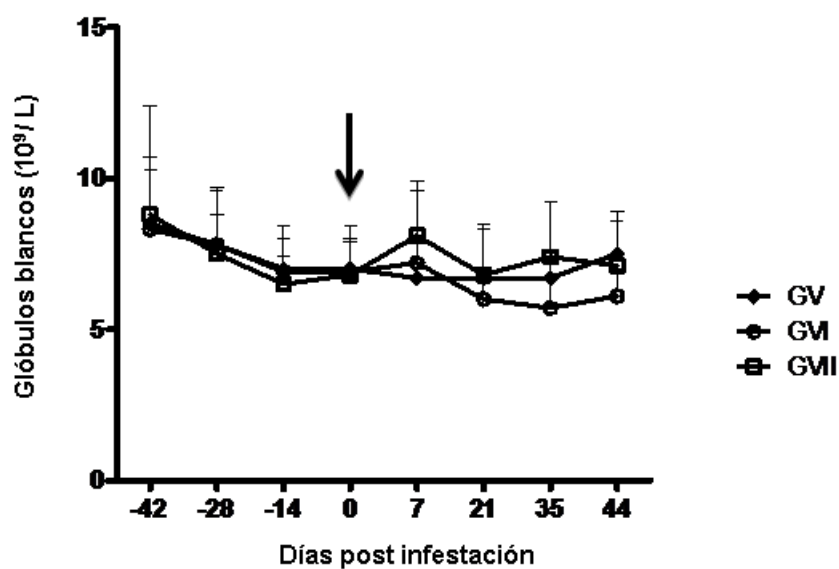


Figura 4.4.16. Los recuentos de los leucocitos de los 3 grupos, el control (GV), primoinfestado (GVI) e infestado y reinfestado (GVII) a lo largo del experimento. Marcado con una flecha el momento de la infestación.

4.4.4.C. Respuesta eosinofílica periférica

Los recuentos de eosinófilos variaron en los diferentes grupos estudiados a lo largo del ensayo como se indica en las Figuras 4.4.17- 4.4.20. Los grupos GI y II mostraron un comportamiento similar a lo largo del ensayo, con incremento de sus valores desde el día 28 post vacunación (-14 PI) y con un pico en el día 7 PI (prepatencia) con valores medios de 0.87×10^3 y de 0.93×10^3 eosinófilos/ μ L para GI y GII, respectivamente.

Los grupos GIII y GIV mostraron un comportamiento similar entre sí a largo del ensayo, con incremento de los recuentos desde el día 7 PI (prepatencia) y un pico el día 21 postinfestación. Los valores medios obtenidos fueron de 1.04×10^3 y de 0.61×10^3 eosinófilos/ μ L para los grupos GIII y GIV, respectivamente.

El grupo primoinfectado mostró una ligera de subida de los eosinófilos desde el inicio de la infestación, para alcanzar un máximo durante el periodo de prepatencia, con un valor de 0.40×10^3 eosinófilos/ μ L y después disminuir hasta casi alcanzar el nivel del grupo testigo (que se mantuvo estable durante el ensayo).

Todos los grupos infestados y vacunados tras alcanzar los niveles máximos, comenzaron a disminuir, excepto el grupo GIV que siguió aumentando sus valores hasta el final del ensayo.

El grupo infestado y reinfestado en comparación con el grupo primoinfectado mostró un aumento de eosinófilos estadísticamente significativo con un valor de 0.94×10^3 eosinófilos/ μ L para alcanzar el máximo durante el periodo de prepatencia, y posteriormente disminuir, aunque exhibiendo valores superiores a los determinados en los grupos primoinfectado y control. Los recuentos de eosinófilos tuvieron una correlación positiva dependiente de la eliminación fecal de huevos durante el ensayo (Figura 4.4.21).

Los análisis procedentes de los días postinfestación mostraron diferencias significativas entre los grupos vacunados (GI y GII) desde el día -14 postinfestación ($p < 0.05$) respecto al resto de los grupos. Además en los días 7, 21, 35 y 44 PI se apreciaron diferencias significativas entre los grupos vacunados y los grupos primoinfectado (GVI) y control (GV). El grupo GI mostró un valor de $p < 0.01$ respecto

al grupo GV, y un valor de $p < 0.001$ respecto al grupo GVI para el día 7 PI. Mientras que en los días 21, 35 y 44 mostró un valor de $p < 0.001$ respecto a ambos grupos GV y GVI.

El grupo GII evidenció diferencias estadísticamente significativas respecto a los grupos GV y GVI con valores de $p < 0.01$ y $p < 0.001$, en los días 7, 21, 35 y 44 PI.

El grupo GIII exhibió en los mismos días diferencias significativas de $p < 0.001$ respecto a ambos grupos GV y GVI, excepto el día 7 PI que mostró una $p < 0.05$ respecto al grupo GVI

Por su parte, en el grupo GIV también se apreciaron significaciones con valores de p desde < 0.01 a 0.001 en los días 21, 35 y 44; en el día 21 se detectó una $p < 0.01$ respecto al grupo control y una $p < 0.05$ respecto al grupo primoinfectado GVI, en el día 35 ($p < 0.01$ respecto a los grupos GV y GVI) y en el día 44 PI ($p < 0.001$ respecto a los grupos GV y GVI).

El grupo infestado y reinfestado (GVII) mostró diferencias significativas respecto al grupo control, en los días 7, 21 y 35 ($p < 0.001$) y respecto al grupo primoinfectado, en los días 7 y 21 con una $p < 0.01$ y en el día 35 con $p < 0.001$.

Todos los grupos vacunados (GI, GII, GIII, GIV) tenían un nivel elevado en los recuentos de eosinófilos en comparación con el grupo infestado y reinfestado (GVII) aunque no fue estadísticamente significativo $p > 0.05$.

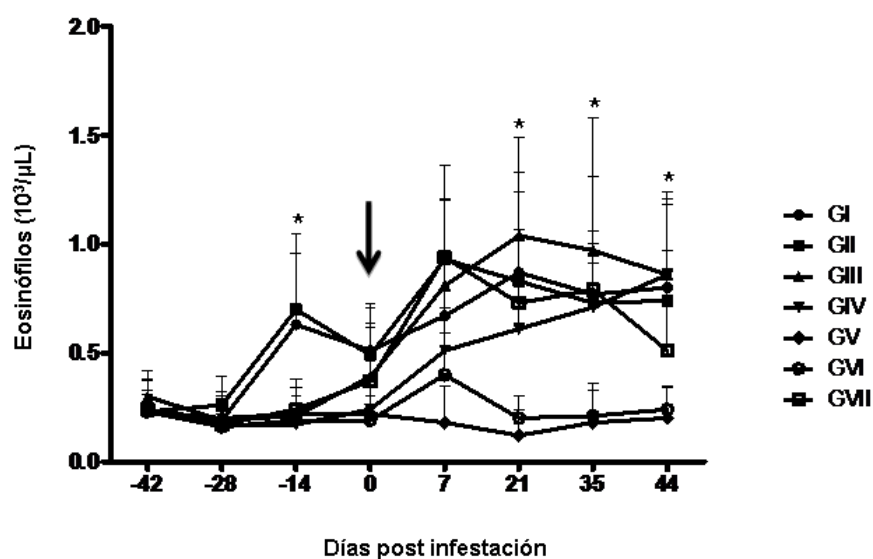


Figura 4.4.17. Los recuentos del eosinófilos de los 7 grupos a lo largo del experimento. Marcado con una flecha el momento de la infestación. *: Diferencias estadísticamente significativas.

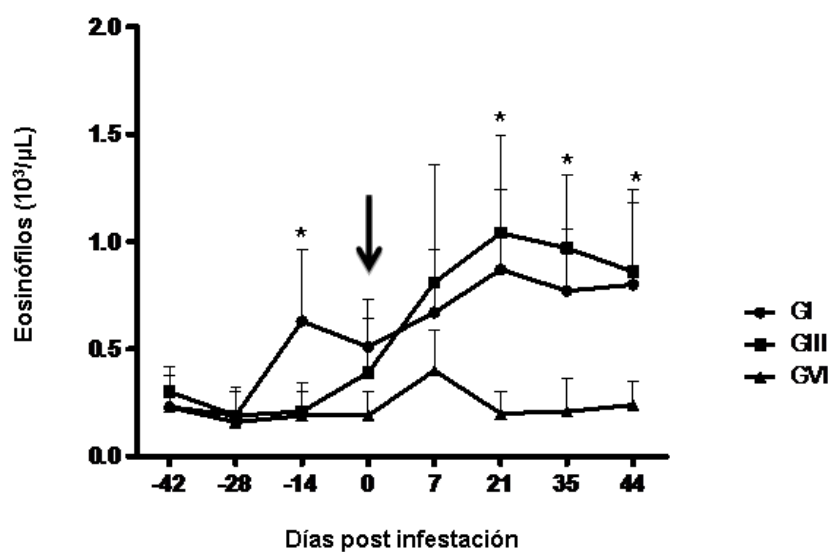


Figura 4.4.18. Los recuentos del eosinófilos en los 2 grupos vacunados con Hc23 (GI + Al OH₃) y (GIII + lipopolisacáridos de *E. coli* y *Propionibacterium* spp.) y el grupo primoinfectado (GVI) a lo largo del experimento. Marcado con una flecha el momento de la infestación. *: Diferencias estadísticamente significativas.

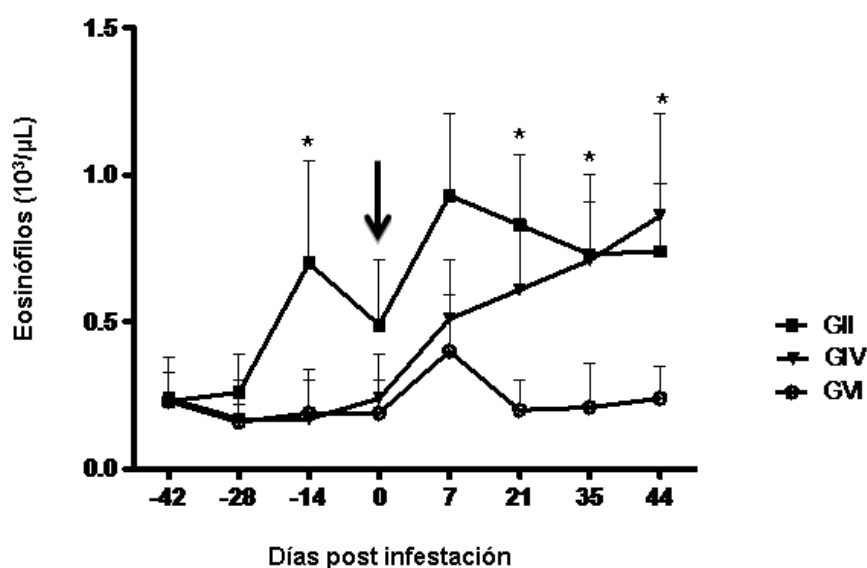


Figura 4.4.19. Los recuentos del eosinófilos de los 2 grupos vacunados con rHc23 (GII + Al OH₃) y (GIV + lipopolisacáridos de *E. coli* y *Propionibacterium* spp.) y el grupo primoinfectado (GVI) a lo largo del experimento. Marcado con una flecha el momento de la infestación. *: Diferencias estadísticamente significativas.

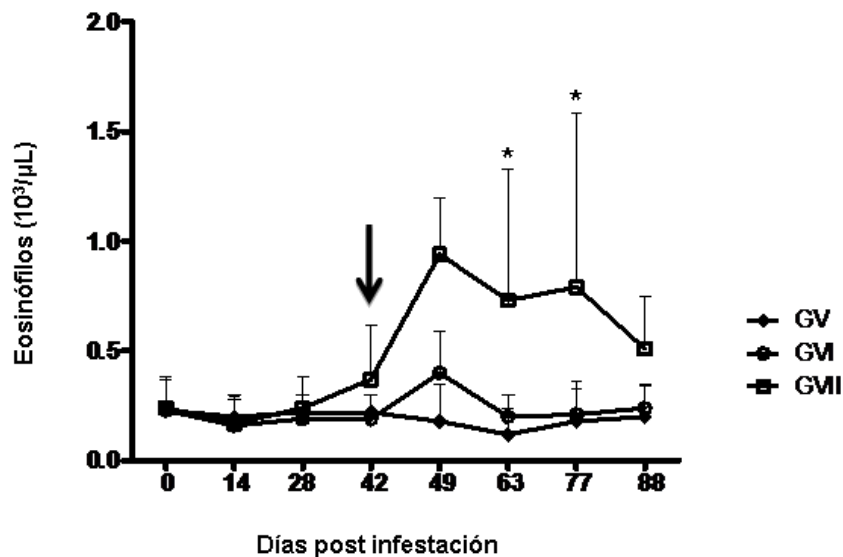


Figura 4.4.20. Los recuentos del eosinófilos de los 3 grupos, el control (GV), primoinfectado (GVI) e infectado y reinfestado (GVII) a lo largo del experimento. Marcado con una flecha el momento de la infestación. *: Diferencias estadísticamente significativas.

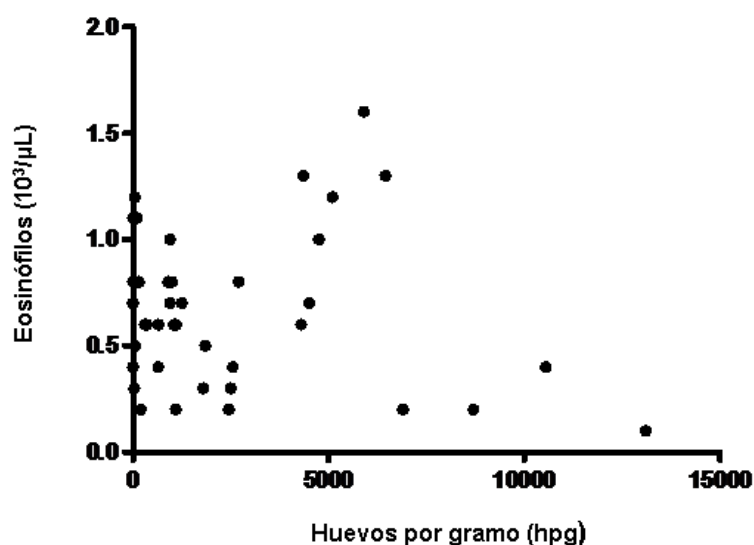


Figura 4.4.21. Correlación entre los parámetros de hpg y eosinófilos de los grupos GI, GII, GIII, GIV, GVI y GVII.

4.4.5. Respuesta inmunitaria

4.4.5.A. ELISA

La respuesta IgG sérica específica frente a *H. contortus* fue valorada, mediante la técnica de ELISA, a lo largo de todo el periodo experimental. Se utilizaron sueros individuales de los animales de las 7 grupos estudiados, correspondientes a 5 momentos del experimento (-8, 0, 1, 3 y 6 semanas postinfestación), y como fuente antigénica, se utilizaron el extracto soluble de adultos (ESA) y la proteína recombinante rHc23 del parásito. Los resultados se expresaron como incrementos de los niveles de absorbancia, medidos a una λ de 405nm (A405). En la Figura 4.4.22 y 4.4.23 aparecen representados los niveles medios de IgG obtenidos en los distintos grupos frente a ambos antígenos.

El análisis de la varianza con medidas repetidas mostró un efecto altamente significativo de tiempo y una interacción significativa entre el tiempo y el nivel de los anticuerpos tanto frente a ESA como con la proteína recombinante ($p < 0.001$).

Hubo una evidencia de la baja respuesta IgG sérica inducida por los animales primoinfectados con *H. contortus* en comparación con los valores obtenidos en el grupo infestado y reinfestado frente ESA, sin embargo, no se apreció ningún incremento similar de los niveles de IgG séricos frente a la proteína recombinante, lo que indicaba,

que a diferencia de la inmunización, la primoinfestación era incapaz de provocar una respuesta de tipo IgG adecuada.

Los animales vacunados (GI, GII, GIII y GIV) mostraron una mayor respuesta de IgG, tanto frente a ESA como frente a la proteína rHc23, que el resto de los grupos.

La respuesta detectada frente al ESA y rHc23 para los grupos vacunados mostró patrones similares pero no coincidentes, observándose en el caso del ESA una elevación gradual de los títulos en los grupos vacunados, a partir del día 42 postvacunación para los grupos GI y GII y durante la 2ª dosis vacunal para los grupos GIII y GIV. Se apreció una mayor respuesta en los grupos GI y GII que en los otros 2 grupos vacunados; aunque sin diferencias significativas ($p > 0.05$).

Los grupos GI y GII alcanzaron su máximo nivel de anticuerpos durante la 1ª semana postinfestación (prepatencia), manteniéndose elevados hasta la 6ª semana postinfestación; por su parte, el patrón de respuesta que presentaron los grupos GIII y GIV mostraba un aumento gradual del nivel de anticuerpos, con una tendencia creciente, alcanzando su máximo la 3ª semana postinfestación y manteniéndose elevados hasta la 6ª semana postinfestación. El grupo VI exhibió una respuesta sérica muy baja, esperable en corderos primoinfestados con *H. contortus*.

El grupo infestado y reinfestado (GVII) mostró una ligera elevación de IgG, durante la prepatencia, que persistió durante la patencia de la infestación, con diferencias significativas respecto a los grupos primoinfestado (GVI) y control (GV) con un valor de $p < 0.01$; y aunque exhibió títulos elevados, fueron inferiores a los detectados en los grupos vacunados.

Durante la infestación de los animales se apreciaron diferencias significativas entre los grupos vacunados (GI, GII, GIII y GIV) en las semanas 0 ($p < 0.01$), 1, 3 y 6 PI ($p < 0.001$) respecto a los grupos primoinfestado (GVI) y control (GV).

La respuesta sérica frente a rHc23, como era esperable, fue marcada en el caso de los grupos vacunados (GI, GII, GIII y GIV), alcanzando el grupo GI niveles medios máximos de absorbancia de 0.84 en la semana 0 postinfestación y en el grupo GII con un valor de 0.78A. En este caso la respuesta observada de ambos grupos siguió una pauta similar; ya que en la semana 0 los niveles de anticuerpos se elevaron

drásticamente y se mantuvieron estable a lo largo de todo el ensayo. Los grupos GII y GIV evidenciaron niveles medios máximos de absorbancia de 0.72 desde la 1ª semana postinfestación (3ª dosis de la vacuna).

Al igual que ocurrió cuando se utilizó como fuente antigénica ESA, los grupos GV, GVI y además el grupo GVII no presentaron una respuesta sérica destacable. Las diferencias fueron estadísticamente significativas entre los grupos vacunados y los demás grupos ($p < 0.001$).

El análisis estadístico de los datos determinó que los grupos GI y GII mostraron diferencias significativas en las semanas 0, 1, 3 y 6 PI, mientras que en los grupos GIII y IV se observó en las semanas 1, 3 y 6 PI, en ambas vacunaciones respecto a los grupos primoinfectado (GVI), infestado y reinfestado (GVII) y control (GV) con un valor de $p < 0.001$. Además los grupos GI y GII mostraron diferencias estadísticamente significativas en la semana 0 con un valor de $p < 0.001$ respecto a los grupos GIII y GIV.

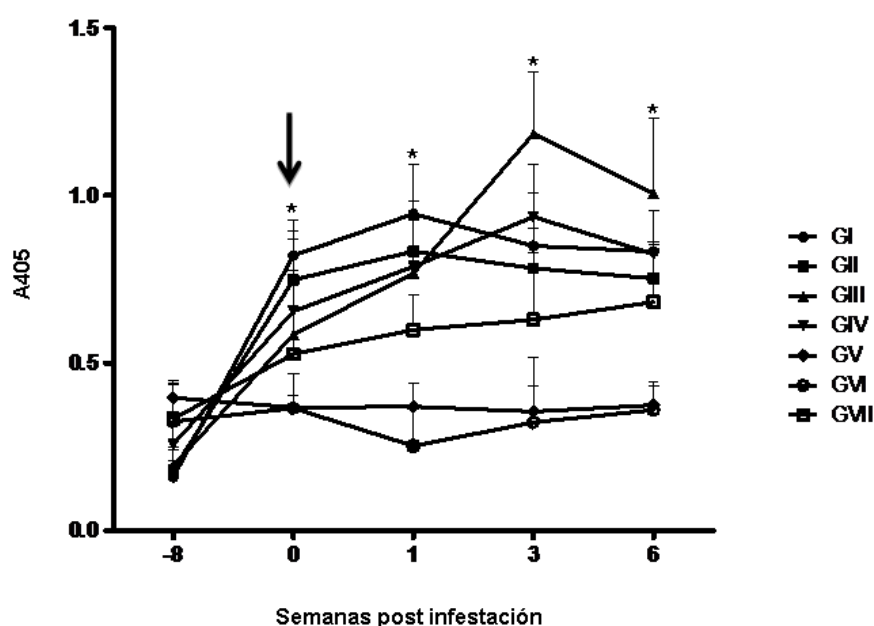


Figura 4.4.22. Respuesta IgG sérica, mediante ELISA, frente ESA de *H. contortus* a lo largo del experimento en los 7 grupos. Marcado con una flecha el momento de la infestación. *: Diferencias estadísticamente significativas.

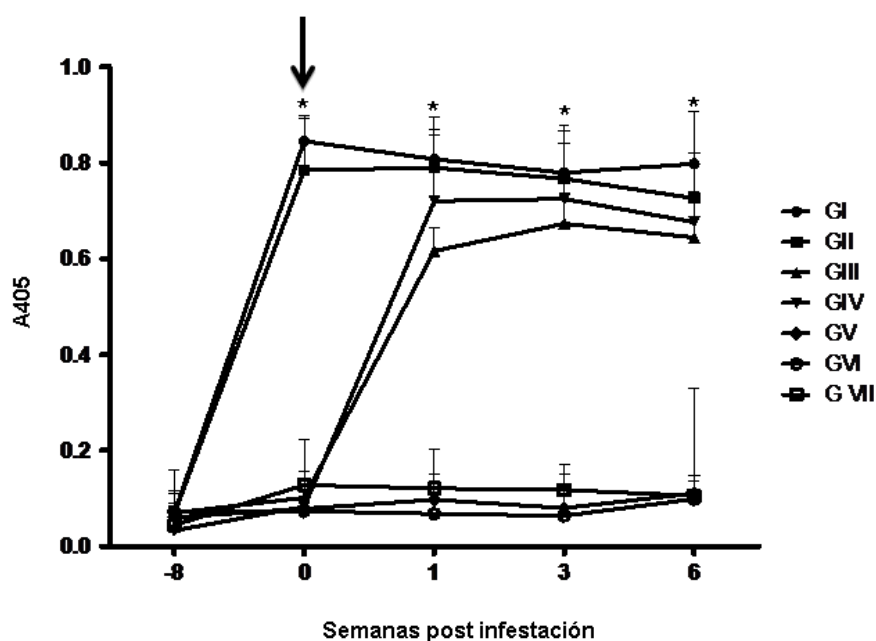


Figura 4.4.23. Respuesta IgG sérica mediante ELISA frente rHc23 a lo largo del experimento en los 7 grupos. Marcado con una flecha el momento de la infestación. *: Diferencias estadísticamente significativas.

4.4.5.B. Western blotting

La realización de WB empleando mezclas séricas frente a ESA y a la proteína recombinante rHc23 en día 21 postinfestación permitió comprobar el reconocimiento de la fracción antigénica Hc23 de todos los grupos vacunados.

Todos los animales de los grupos vacunados (GI, GII, GIII y GIV) (Figura 4.4.24) reconocieron la región de *ca.* 23 KDa con mayor intensidad. Es destacable el hecho de que todos los sueros de los animales vacunados (GI, GII, GIII y GIV) reaccionaran con una región de *ca.* 46 KDa. Esta banda fue reconocida durante todo el experimento y confirma la presencia del dímero de la proteína, que también fue inmunorreconocido pero con menor intensidad.

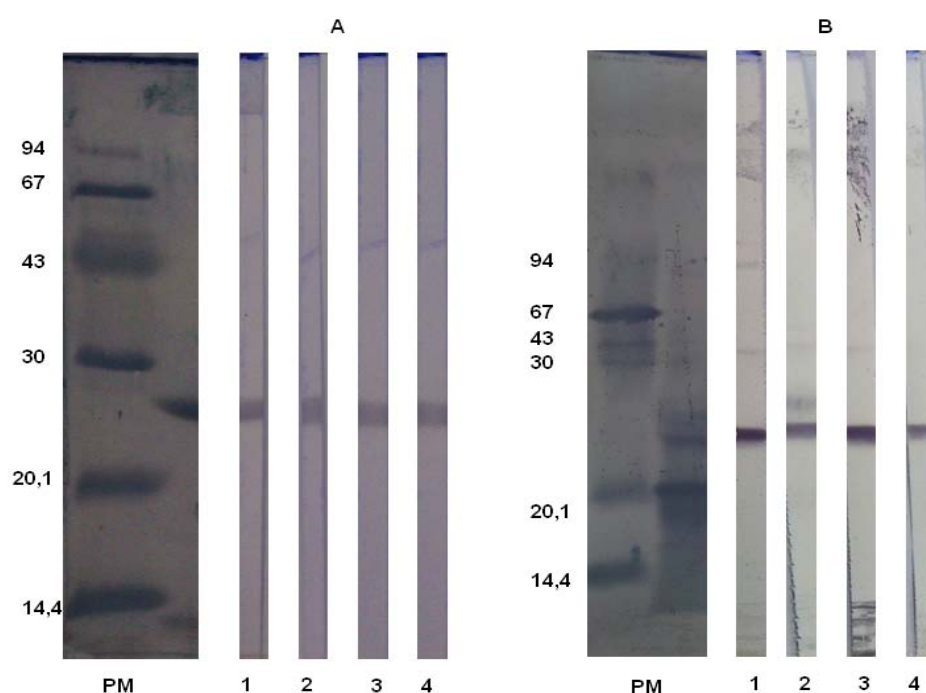


Figura 4.4.24. Inmunodetecciones realizadas con rHc23 (A) y ESA (B) enfrentadas a una mezcla sérica corderos vacunados con Hc23 (día 21 PI). GI (1), GII (2), GII (3) y GIV (4). A la izquierda se muestran los marcadores en PM en KDa.

Los sueros del grupo testigo (mezclas séricas e individuales) frente ESA y rHc23 no presentaron reacción en la región *ca.* 23 KDa, tal y como era esperable ya que estos animales nunca estuvieron en contacto con el parásito.

La realización de WB con sueros individuales del día 21 PI para los grupos primoinfectado (GVI) y grupo infestado y reinfestado (GVII) frente ESA y rHc23 evidenció la incapacidad de los animales del grupo primoinfectado para reconocer la región *ca.* 23 KDa frente ESA; por su parte, el 57% de los animales del grupo infestado y reinfestado (n° 44, 45, 47 y 48) reaccionaron con una intensidad moderada en la región *ca.* 23 KDa.

Cuando se utilizó como fuente antigénica la proteína recombinante (rHc23), se apreció que el 57% de los animales pertenecientes al grupo primoinfectado (n° 36, 37, 38 y 41) eran capaces de detectar de forma ligera la región *ca.* 23 KDa, mientras que todos los individuos del grupo infestado y reinfestado inmunorreconocían la banda de 23 KDa., e incluso algunos animales con una mayor intensidad (n° 44, 45, 47 y 48), que

ya habían mostrado un mayor reconocimiento con el extracto soluble de adultos del parásito (Figura 4.4.25).

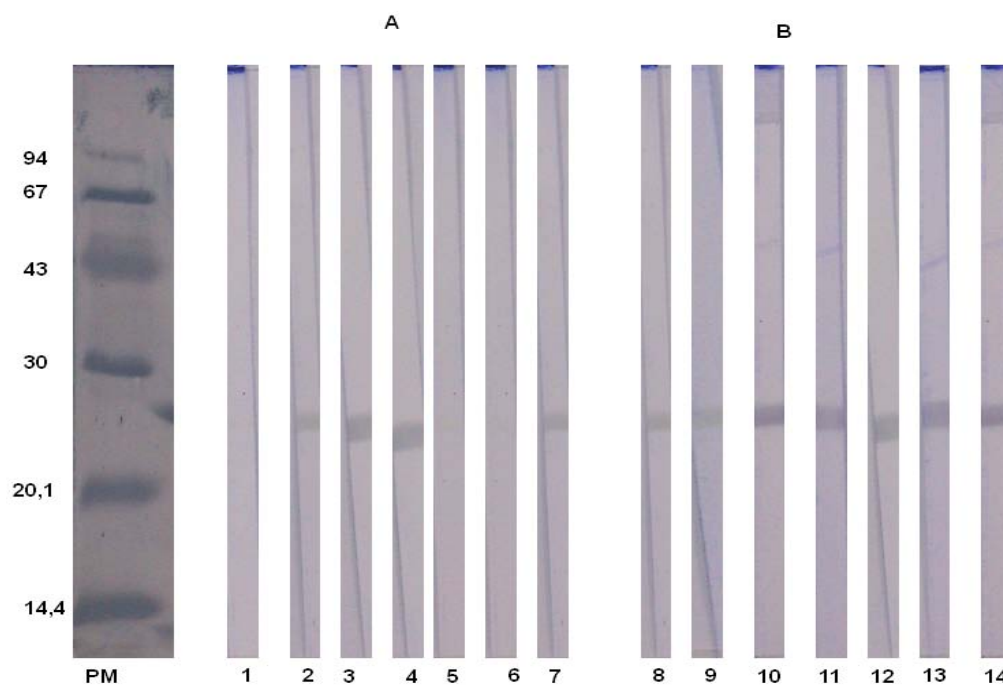


Figura 4.4.25. Western – blot de rHc23 enfrentado a muestras séricas individuales de 14 animales (día 21 PI). Carriles 1-7, los animales del grupo primoinfectado (nº 35-41) (GVI). Carriles 8-14, los animales del grupo infestado y reinfestado (nº 42-48) (GVII). A la izquierda se muestran los marcadores en PM en KDa.

5. DISCUSIÓN

H. contortus es uno de los nematodos gastrointestinales (NGI) más importantes que afectan al ganado ovino y caprino a nivel mundial. La hemoncosis representa el 15 % de las gastroenteritis parasitarias que afectan a estos animales (www.fao.org) y causa las mayores pérdidas económicas de todas las tricostrongilidosis (Cantacessi *et al.*, 2010). El control de las infestaciones por este parásito se basa esencialmente en el uso de antihelmínticos, y pese a que estos han sido útiles durante décadas, su utilización indiscriminada ha provocado la aparición de resistencias farmacológicas en todo el mundo (Waller, 1997). Además, los nuevos fármacos [i.e. derivados amino-acetonitrílicos (ADDs) – Kaminsky *et al.*, 2008] solo están disponibles en algunos países por lo que el empleo de métodos alternativos de control se hace imprescindible. La utilización de la inmunoprofilaxis que permita estimular o aumentar la inmunidad adquirida del hospedador (Miller y Horohov, 2006) constituye una opción a considerar; no obstante, por el momento no ha sido posible la obtención de ninguna vacuna comercial frente a ningún nematodo gastrointestinal (Cachat *et al.*, 2010).

En nuestro trabajo nos hemos propuesto la obtención de un método inmunoproláctico frente a la hemoncosis ovina por *H. contortus*. En el desarrollo de una vacuna son esenciales tanto la selección del adyuvante adecuado como del inmunógeno capaces de inducir una respuesta protectora en los hospedadores sometidos al reto parasitario. En este sentido, al igual que otros autores [Schallig y van Leeuwen, 1997; Domínguez-Toraño *et al.*, 2000; Alunda *et al.*, 2003 con - antígenos de excreción/secreción (E/S), antígenos de la superficie externa del parásito o los constitutivos del helminto (antígenos somáticos)] hemos optado por el empleo de un “antígeno público”. La ventaja de esta aproximación se relaciona con su capacidad para inducir una respuesta inmunitaria de modo natural durante el transcurso de las infestaciones, sin necesidad de revacunación posterior (Newton y Meeusen, 2003). De hecho, la protección natural observada en infestaciones naturales en animales expuestos al helminto apoya el valor inmunoproláctico frente a la hemoncosis ovina de los antígenos parasitarios expuestos. En nuestro caso, las evidencias experimentales obtenidos con anterioridad aconsejaron la selección de un antígeno presente en una fracción de bajo PM parcialmente purificada a partir de adultos de *H. contortus* y denominada p26/23 (Domínguez-Toraño *et al.*, 2000; García-Coiradas *et al.*, 2010).

Otros autores (Boisvenue *et al.*, 1992; Munn, 1997; Newton y Munn, 1999) han empleado antígenos denominados “ocultos” (i.e. antígenos H11, H-gal-GP y cisteínproteasas - que no son reconocidos por el sistema inmunitario del hospedador durante el curso de la infestación y por tanto no están sometidos a la presión de selección. Esta aproximación, similar a la utilizada en la vacunación (Bm86) frente a las infestaciones por *Boophilus microplus* (Ixodida), ha logrado, aparentemente, elevados niveles de protección en condiciones experimentales. Sin embargo, gran parte de estos antígenos ocultos, procedentes del intestino del nematodo, solo son capaces de generar elevados niveles de anticuerpos cuando se les administra experimentalmente, de forma repetida, lo que implica el encarecimiento de su empleo (Smith *et al.*, 2001).

Los nematodos, a diferencia de otros grupos parasitarios, son difíciles de mantener en los laboratorios; no se multiplican *in vitro* por lo que su mantenimiento es complejo y costoso. La obtención de antígenos parasitarios implica, por tanto, la infestación de un gran número de animales donadores (ganado ovino) y su rendimiento es escaso. En estas condiciones es imprescindible el empleo de métodos alternativos que faciliten la consecución de suficiente cantidad de antígeno. Uno de los procedimientos más utilizados es la tecnología de ADN recombinante. Durante las dos últimas décadas se han realizado numerosos ensayos para lograr la expresión y purificación de antígenos recombinantes con capacidad para inducir niveles de protección similares a los logrados con las formas nativas (Emery *et al.*, 1993; Schallig y van Leeuwen, 1997, entre otros). No obstante en las pruebas de campo realizadas las proteínas recombinantes han sido incapaces de reproducir las expectativas generadas por sus proteínas nativas originarias (Newton y Meeusen, 2003; Knox, 2010); la falta de correlación entre los resultados logrados con las formas nativas y las proteínas recombinantes se ha achacado a la pérdida de componentes (posiblemente azúcares) que pueden afectar a la capacidad inmunógena de los antígenos obtenidos mediante tecnología ADN recombinante.

Para la obtención del gen que codifica la proteína Hc23 partimos de la extracción inicial del ARN total procedente de adultos del helminto. En nuestras condiciones la utilización de TRi-Reagent permitió obtener ARN de mayor pureza (a juzgar por la relación 260/280), superior rendimiento y menor degradación. Este método, utilizado de forma mayoritaria (Hartman *et al.*, 2003; Rufener *et al.*, 2009; García-Coiradas *et al.*, 2010, entre otros) permite el procesado de un gran número de

muestras y puede ser considerado como una alternativa frente a los métodos comerciales.

La síntesis de ADN copia (cADN) del helminto, procedente del ARN parasitario obtenido, permitió la construcción de una biblioteca de cADN de *H. contortus* en el fago λ ZAP II; el inmunocribado de la misma mediante Southern blotting facilitó la detección de la secuencia completa del gen que codifica Hc23. Nuestros resultados en esta especie de nematodo están en la línea de los obtenidos con un método comparable por Schallig *et al.* (1997b) a partir de mRNA de preadultos (L5) de *H. contortus*, para determinar el gen que codifica proteínas de E/S y Rufener *et al.* (2009) a partir de mRNA de adultos de *H. contortus* para obtener la secuencia completa del gen que codifica la Hco-mptl-1. También se han logrado resultados favorables en *Ostertagia* (Vercauteren *et al.*, 2003). El método empleado por nosotros, por tanto, ha sido adecuado y la biblioteca obtenida (λ ZAP II cADN) permite la conservación de una copia completa del genoma de *H. contortus* durante largos periodos y posibilita el inmunocribado de diferentes antígenos que puedan presentar cierta capacidad inmunoprotectora o inmunodiagnóstica. Por ello, la aproximación empleada constituye una excelente herramienta de la biología molecular que permite conseguir, mediante métodos de cribado, una fuente sustitutiva del material nativo del parásito .

La construcción, a partir del cADN de *H. contortus* fraccionado, de 3 bibliotecas (0.5-2 Kb, 2-4 Kb y > Kb 4) nos permitió minimizar la posible pérdida de los clones raros y mantener la representación y la estabilidad de la biblioteca a largo plazo (Draper *et al.*, 2002). La elección del fago λ para la construcción de las bibliotecas de cADN se debió a que facilita la escisión del cADN del plásmido y el proceso de cribado; además estas bibliotecas siguen siendo la fuente más habitual para la clonación de todo o casi todo el cADN. Permite asimismo la utilización de la PCR para el rápido aislamiento de los halos específicos de las bibliotecas más complejas y es capaz de mantener grandes insertos de hasta 10 Kb y de propagar clones con el cADN insertado, a diferencia de otros vectores de clonación (Draper *et al.*, 2002; LeBlanc-Straceski *et al.*, 2006).

En nuestro estudio, con el fin de determinar la longitud total del gen que codifica la proteína Hc23, hemos empleado la biblioteca de cADN del parásito y una sonda marcada con digoxigenina, marcador no radiactivo y compatible con sistemas bacterianos y de mamíferos (McCreery, 1997). La combinación, empleada por nosotros,

de Southern blot y de PCR es un procedimiento adecuado para confirmar la longitud total de un inserto y su aislamiento (i.e. Wilfinger *et al.*, 1997 y Campbell y Choy, 2002). Nuestros resultados por Southern blot revelaron un número limitado de sustituciones (y pocos cambios de aminoácidos), lo que sugiere que el gen que codifica la proteína Hc23 es muy conservado.

Hemos clonado y expresado con éxito el gen que codifica las proteínas Hc23 y rHc23 en el vector de expresión PET-29b (+) que permite la expresión y purificación de una gran cantidad de proteína. La elección de este vector se debe a su estabilidad y a que comprende el sistema de expresión T7 (con el promotor T7 y T7 RNA polimerasa) que mejora el sistema de expresión de las proteínas (Xu *et al.*, 2005). Este sistema de expresión utiliza cepas deficientes en proteasas como *E. coli* BL 21 (DE3) que facilitan el plegamiento adecuado de las proteínas que contienen más de un enlace disulfuro (como en nuestro caso) (DE3) (Dalton *et al.*, 2003) y ha sido ampliamente empleado para la expresión de proteínas de membrana de (Cheng *et al.*, 1996; Kästner *et al.*, 2000; Korepanova *et al.*, 2005).

La proteína recombinante rHc23 llevaba asociada una cola de 6 histidinas lo que permitió su purificación utilizando una columna de níquel ácido nitrilotriacético (Ni-TNA) mediante cromatografía de afinidad. Este sistema de extracción se considera rápido, a la vez que permite que la proteína nativa conserve su estructura natural (Carson *et al.*, 2007). La elución de la proteína se llevo a cabo empleando una concentración relativamente alta de imidazol (100-250 mM), ya que mostraba un buen acoplamiento con la columna de níquel, de manera que fue imprescindible elevar la dosis del imidazol para asegurar la purificación adecuada y completa de la proteína.

No se halló ninguna secuencia idéntica a Hc23 en las bases de datos. No obstante, su secuencia de nucleótidos mostró una homología elevada con Hc-d11-12G12-SKLP, Hc-ad-14G01-SKLP, la proteína hipotética F57H123, cADN clon Hc-ad-20 B02 y cADN clon Hc-ad-21 H05 (Gen Bank). De igual modo, Hc23 presentó un 22% de semejanza con las proteínas hipotéticas (con función desconocida) de *Caenorhabditis elegans* y de *Onchocerca volvulus* (OV20) (Vercauteren *et al.*, 2003). El PM deducido de Hc23 (ca. 23 KDa) sugería su posible identidad con los péptidos de S/E de bajo PM de *H. contortus* señalados por Schallig *et al.* (1997b). Estos autores hallaron 2 péptidos de 15 y 24 KDa. El análisis completo de su longitud mostró un

péptido de 24.6 KDa (222 AA) y otro de 17.2 KDa (148 AA y un péptido señal de 30 AA). En nuestro caso, Hc23 exhibió un número de aminoácidos más reducido (204 AA). Estos resultados apuntaban a la falta de identidad de ambas proteínas. Además, las secuencias N-terminal de AA fueron diferentes ya que la proteína 24 KDa tenía una secuencia SMXPDTNCMSDEVXXTFVN, mientras que Hc23 mostró una secuencia MRTLVLVVAISVAAVSAAGLFA). Asimismo se llevaron a cabo búsquedas en NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) para determinar homologías entre la secuencia de AA de la proteína Hc23 y otras proteínas de nematodos. Los resultados obtenidos confirmaron nuevamente las diferencias (Figura 5.1).

1	M	-----	31
1	M	-----ISKVVFVAVLLAVVAV--HAKP-----G-GRRSPPCGIP	31
1	M	MMLFCGIKGLYSGGKGHRSSMTISKFAAALLLLAITI--EAKPCFGRGCGFRPPPPCGLP	58
1	M	MI-----SNIFKISAALLLLTIV--SEAKPCFGRGCG-GRPPPPCGLP	39
1	M	-----ISKFAAALLLLLAIADSEAKPCFGRGCG-GRPPPPCGLP	38
1	M	-----ISKVAAALLLLLTIA--SEAKPCFGRGCG-GRPPPPCGLP	36
1	M	-----ISKVAAAVLLLLAIA--SEAKPCFGRGCG-GRPPPPCGLP	36
32			91
32	P	FFLDSLPEDAQEKINDIWKDYKEGDKCYEEQGLTREVIDALPKEARKNLHKRPSL-PFLK	90
59	P	FLEDLPAAEQTKITEIWKDYKEGDKCYEEQGLTREVMESLPKDVRKSIHKRPPL-PFLR	116
40	P	FLEDLPDQVTKITEIWKDYKEGDKCYEEQGLTREIMESLPKDVRKSIHKRPPL-PFLR	98
39	P	FLEDLPDAQVKITEIWKDYKEGDKCYEEQGLTREVMESLPKDVRKSIHKRPPL-PFLR	97
37	P	FLEELPSDAQAKINEIWKDYKEGDKCYEEQGLTREIIDALPKDVRKSIHKRPPL-PFLR	95
37	P	FLEELPSDAQAKINEIWKDYKEGDKCYEEQGLTREIIDALPKDVRKSIHKRPPL-PFLR	95
92			151
91	G	VPKETLEKFESIFKDKTVPWSEKPEKIEALAEKELTGDNLKKFKEFKEKKEKEDKEYKE	150
117	G	LPKDIIAKFDAIFKDKSIPFAQKPEKVDALAEVLTGDNLKKFQEFKEKREKEEQEYKE	176
99	G	LPKDILAKFDAIFKDKSIPFSEKPEKIDALAEVLTGDNLKKFQEFKEKKEKEMQEYKD	158
98	G	LPKNILAKFDAIFKDKSIPFSQKPEKIDALAEQLLTGDNLKKFQEFKEKKEKEDKEYKE	157
96	G	LPKDVLAKFDAIFKDKSIPFSQKPEKIDALAEQLLTGDNLKKFQEFKEKKEKEDKEYKE	155
96	G	LPKDVLAKFDAIFKDKSIPFSQKPEKIDALAEQLLTGDNLKKFQEFKEKKEKEDKEYKE	155
152			199
151	K	ESKLSDEA-----KKAHEKIEALNKQKFEILGELSEKAKEELFDLWKS RPHFR	198
177	K	EAKLSPAA-----KEANEKLEALGKQKFAILEELDEEVKDELFDLWKS RPHGP	225
159	K	ESKLSAAA-----KVANEKLEALGKQKFAILEELDENVKDELFDLWKS RPHGP	207
158	K	EAKLSPAA-----KEAYEKLEALGKQKWAIEDLDEDVKDELFDLWKS RPHGP	206
156	K	EAKLSPAA-----KEAHEKLDALSKQKFAILEELDEDVKDELFDLWKS RPHGP	204
156	K	EAKLSPAA-----KEAHEKLDALSKQKFAILEELDEDVKDELFDLWKS RPHGP	204
200		-----KD	203
199	G	G-HHGGKKH	208
226	P	RPRHH----	231
208	P	R-HH-----	211
207	P	R-HH-----	210
205	P	R-HH-----	208
205	P	R-HH-----	208

Figura 5.1 Homología entre Hc23 y otras proteínas de nematodos. 1, Hc23 de *H. contortus*. 2, proteína hipotética CAEBREN_05254 [*Caenorhabditis brenneri*]. 3, proteína CBR-ORA-1 [*Caenorhabditis briggsae*]. 4, antígenos ORA-1 [*Onchocerca*]. 5, proteína CRE-ORA-1 [*Caenorhabditis remanei*]. 6, proteína CBN-ORA-1 [*Caenorhabditis brenneri*]. 7, proteína hipotética CAEBREN_31722 [*Caenorhabditis brenneri*].

La secuencia de la proteína Hc23 mostró en el extremo N-terminal una homología del 100% con las de las proteínas de PM similar identificadas por Domínguez-Toraño *et al.* (2000) y García-Coiradas *et al.* (2010) (AGLFAHHPPP) en adultos de *H. contortus* y forma parte del extremo N terminal de Hc23 (M **AGLFAHH**). Estos resultados apuntaban a la falta de identidad entre Hc23 y las proteínas E/S de *H. contortus* identificadas por Schallig *et al.*

(1997b). Además, Hc23 se localiza, aparentemente en cordones hipodérmicos (García-Coiradas *et al.*, 2010) mientras que E/S 24 KDa se detectó en el esófago de los helmintos adultos (Schallig *et al.*, 1997b).

Una fracción soluble de adultos de *H. contortus*, conteniendo proteínas PM comparable a Hc23, fue obtenida por Gómez-Muñoz *et al.* (1996) mediante cromatografías de gel filtración e intercambio iónico secuenciales. Desafortunadamente no fue posible la purificación de la proteína. Los métodos empleados por Domínguez-Toraño *et al.* (2000) y, en particular, García-Coiradas *et al.* (2010) permitieron purificar Hc23. En ambos casos se empleó, de forma previa, una cromatografía de afinidad para eliminar la GST del extracto, sin papel protector frente a la hemoncosis (Sharp *et al.*, 1991; van Rossum *et al.*, 2004) pero de PM similar (ca. 26 KDa en SDS-PAGE; 23,6 KDa mediante espectrometría de masas) a Hc23. García-Coiradas *et al.* (2010) logró purificar la proteína en su forma nativa mediante extracción desde membranas de nitrocelulosa y elución. Este procedimiento evitaba la cromatografía de alto rendimiento de fase reversa de (RP-HPLC). Sin embargo, con ambos métodos de purificación el rendimiento fue muy escaso.

La cromatografía de inmuoafinidad ha sido considerada un método adecuado para la purificación de proteínas (Bora *et al.*, 1996). La utilización de esta técnica con anticuerpos policlonales procedentes de un suero hiperinmune de conejo (obtenido frente a la proteína rHc23) permitió el aislamiento con un rendimiento elevado de la proteína nativa Hc23 (21.7% frente al 9.3% obtenido con la extracción desde las membranas de nitrocelulosa) a partir de ESA, en un único paso. Este resultado apoya el valor de la cromatografía de afinidad con anticuerpos como alternativa de purificación a métodos cromatográficos más laboriosos.

La secuencia de aminoácidos completa de Hc23 no ha sido identificada hasta el presente estudio a pesar de las secuencias parciales obtenidas o deducidas anteriormente (Domínguez-Toraño *et al.*, 2000; García-Coiradas *et al.*, 2009). Ello, junto con la falta de homologías de Hc23 con las secuencias accesibles no permite conocer su estructura y posible función biológica. La presencia de los primeros 20 AA de Hc23 de carácter hidrofóbico señala su localización en el lado citoplasmático de la membrana (transmembrana) y por ello su posible papel como receptor, participación en canales

iónicos (Herve y Sarrouilhe, 2005) o transportador (Launay-Vacher *et al.*, 2006). La secuencia de Hc23 mostró un dominio de función desconocida (DUF-148), incluido en un grupo conservado de nematodos (Pfam 02520, NCBI-Blast) y hallado en *C.elegans* y *C.briggsae*, localizado también en cordones hipodérmicos (OV17) o/y en una molécula similar a la queratina (Sasisekhar *et al.*, 2005). Asimismo, Hc23 presentó cuatro lugares de fosforilación, quizás relacionados con una interacción específica proteína-proteína (Levy *et al.*, 2009) pero de función desconocida. No es posible, en este momento, conocer el papel de Hc23 en *H. contortus*. Sin embargo, la disponibilidad de anticuerpos anti-Hc23, junto con su localización en el helminto adulto (García-Coiradas *et al.*, 2009), suministra herramientas experimentales para determinar in vivo su papel.

En el análisis de la caracterización de la proteína Hc23 (tanto en su forma nativa como recombinante) se comprobó, en nuestro caso, que cuando se enfrentaba la proteína Hc23 con sueros de animales infestados con *H. contortus* (Western blot) mostraba dos inmunorreconocimientos, uno de PM ca. 23 KDa y otro (más débil) de aproximadamente 46 KDa. Este mismo hallazgo había sido obtenido por Domínguez-Torano *et al.* (2000), con una fracción soluble entre 23 y 26 KDa, y García-Coiradas *et al.* (2009) con la proteína defectiva p26/23. Estos últimos autores confirmaron que la reactividad de mayor PM podría corresponder a un dímero de Hc23. La dimerización de proteínas, además de reducir el tamaño del genoma, aumentar la estabilidad, producción modular y accesibilidad a sus sitios activos, desempeña un papel muy relevante en la regulación de su actividad (Marianayagam *et al.*, 2004).

Las secuencias obtenidas en la proteína Hc23 aislada de adultos de *H. contortus*, con el método de inmunoafinidad y la proteína recombinante producida (rHc23) mostraron una homología del 100% en su extremo amino, lo que confirmaba el éxito de la clonación y expresión de Hc23.

En nuestro estudio hemos valorado la eficacia de la vacunación frente a la hemoncosis experimental utilizando tanto la proteína Hc23 nativa como la recombinante (rHc23). Dicha eficacia ha sido determinada teniendo en cuenta diversos parámetros, tales como la reducción en el número de adultos recuperados, la disminución del número de huevos eliminados, el nivel de los eosinófilos y la elevación del hematocrito. En la actualidad se considera esencial para determinar el grado de una infestación por

H. contortus no solo la valoración de los parámetros parasitológicos tales como la duración del periodo de prepatencia, valores de hpg, o carga parasitaria (hpg y carga parasitaria), sino también las modificaciones en los valores hemáticos (i.e. Boisvenue *et al.*, 1991; Domínguez-Toraño *et al.*, 2000; Rowe *et al.*, 2008; Di-Loria *et al.*, 2009) y zootécnicos.

En nuestras condiciones, la inmunización de los corderos con Hc23, a pesar de las variaciones individuales observadas, provocó un alargamiento del periodo de prepatencia y significativamente menores eliminaciones de huevos de *H. contortus* en las heces de los animales sometidos al reto. Hay que señalar que la reducción observada en los grupos de animales vacunados fue comparable a la hallada en los corderos primoinfectados, y por ello parcialmente resistentes. El periodo prepatente observado en los grupos (GVI y GVII) durante la primoinfección fue de 15 a 21 días PI, mientras que en la reinfestación (GVII) se detectó un alargamiento (entre 24-35 días PI) resultados similares a los señalados por otros autores en ensayos de reinfestaciones con infestaciones previas (Cuquerella *et al.*, 1994; Gómez- Muñoz *et al.*, 1998,1999, entre otros). Son escasos los estudios de inmunización que utilizan este parámetro como un marcador en el desarrollo de la protección (i.e. Domínguez-Toraño *et al.*, 2000; Alunda *et al.*, 2003; Vervelde *et al.*, 2003).

La dinámica de la eliminación fecal de huevos mostró un incremento progresivo de los valores en todos los grupos del ensayo, se alcanzó un máximo de 10100 hpg en el día 24 PI en el grupo primoinfectado, mientras que los grupos vacunados y el grupo infestado y reinfestado mostraron unos valores medios próximos a 1709 y a 1000 hpg, respectivamente. Dicha eliminación fecal de huevos alcanzó un pico máximo durante la cuarta semana, momento a partir del cual comenzó su descenso hasta su estabilización al final del ensayo; estos resultados podrían interpretarse como una supresión de la fecundidad de las hembras parásitas. Los resultados obtenidos tras el reto parasitario son no obstante, difíciles de valorar, debido a la escasez de publicaciones que muestren patrones de este tipo tras un ensayo de vacunación (Knox *et al.*, 2003; Newton y Meeusen, 2003; Knox, 2010), salvo contadas excepciones (i.e. Smith, 2007).

La mayoría de los autores coinciden en que la eliminación fecal de huevos en las heces de los animales es el parámetro que guarda una mayor correlación con la carga parasitaria en las ovejas y por tanto, representa el mejor marcador fenotípico de

resistencia (Douch *et al.*, 1996; Bakker *et al.*, 2004). Teniendo en cuenta esta premisa, la inmunización con Hc23 provocó una significativa protección en los animales (con una reducción media de los recuentos fecales de *ca.* 72%) porcentaje incluido dentro del amplio margen de protección observado por otros autores (32% - > 90%) (Schallig y van Leeuwen, 1997; Newton y Munn, 1999; Domínguez-Toraño *et al.*, 2000; Knox *et al.*, 2003, entre otros).

De forma consistente, en los recuentos de adultos en el abomaso, se apreció una reducción media (*ca.* 81%) de la población parasitaria en los grupos vacunados cuando se comparó con los recuentos hallados en el grupo infestado sin vacunación; nivel de reducción que fue similar al detectado por otros autores (desde 60% hasta > 85%) (Schallig y van Leeuwen, 1997; Newton y Munn, 1999; Domínguez-Toraño *et al.*, 2000; Knox *et al.*, 2003). Ya que no se efectuaron sacrificios seriados no se pudo determinar la dinámica del desarrollo larvario en el abomaso ni se cuantificaron las L4 en la mucosa gástrica al final del experimento. La ratio hembras: machos del helminto no mostró variaciones significativas. En distintos ensayos se han obtenido resultados diversos, desde algunos sin diferencias (estudio presente; Zhao *et al.*, 2012) hasta otros con una mayor reducción de la población de hembras (i.e. Smith *et al.*, 1993, 1999). Es posible que la propia población infestante administrada fuese la responsable de tales diferencias en los experimentos anteriores y en el llevado a cabo por nosotros.

Una menor carga parasitaria fue detectada en los grupos vacunados (valor medio *ca.* 187) y en el grupo reinfestado (104 adultos en el abomaso) en comparación con el grupo primoinfectado (1030 adultos); dicha carga fue a su vez inferior a la detectada por Cachat *et al.* (2010) en un ensayo de vacunación con H-gal-GP, donde asimismo obtuvieron un porcentaje de protección inferior al nuestro (próximo al 72%). Estos resultados apuntan a la importancia de la determinación de la carga parasitaria como marcador de resistencia (Gauly *et al.*, 2002; Bricarello *et al.*, 2004; Amarante *et al.*, 2005).

El estudio del valor hematocrito (Hto) en la hemoncosis es imprescindible ya que se correlaciona negativamente con los valores de hpg y la carga parasitaria por lo que podría considerarse como una forma de estimación indirecta de la virulencia del parásito (Eysker y Ploeger, 2000) o bien del grado de protección alcanzado como consecuencia de una primoinfección + reinfestación o de una inmunización. En

nuestro ensayo, la caída del Hto se inició coincidiendo con el final del periodo prepatente, mostrando una ligera disminución, dentro de los márgenes fisiológicos, en todos los grupos inmunizados. Sin embargo, los animales pertenecientes al grupo primoinfectado exhibieron una caída notable de sus valores. A pesar de estas variaciones durante las infestaciones, los animales mostraron una recuperación del hematocrito hacia el final del experimento (45 días PI). Este patrón que se establece en los animales suele ser el habitual en presencia de estos nematodos hematófagos como consecuencia de la recuperación de la eritropoyesis (Khan *et al.*, 1988; Wallace *et al.*, 1995; Newlands *et al.*, 1999). La existencia de una alta correlación negativa ($r = -0.82$) entre el valor del hematocrito y los recuentos fecales de huevos, apunta al interés de la estimación de este parámetro como un buen indicador para determinar la intensidad de la infestación y el grado de protección alcanzado. La correlación observada estuvo en la línea de lo obtenido por (Gauly *et al.*, 2002; Kahiya *et al.*, 2003; Bricarello *et al.*, 2004; Castillo *et al.*, 2011).

En los grupos de corderos vacunados y en el grupo reinfestado (primoinfectado + reinfestado) se detectó un ligero incremento no significativo en el número de leucocitos en comparación con el grupo control. El grupo exclusivamente primoinfectado, por su parte, mostró una ligera disminución aunque siempre dentro de los márgenes de la normalidad. Se ha señalado el papel de este tipo celular en la eliminación de los NGI adultos (Aguilar-Caballero *et al.*, 2006) al observarse correlaciones negativas entre sus niveles y la carga parasitaria, por lo que tendrían un valor marcador de resistencia (Bricarello *et al.*, 2004; Amarante *et al.*, 2005). Sin embargo, en otros casos no se ha observado esta respuesta (i.e. Gómez-Muñoz *et al.*, 2001) y probablemente la valoración global en sangre periférica es más dificultosa.

Consideraciones similares pueden ser hechas acerca de los resultados obtenidos en la determinación en sangre periférica de eosinófilos. La elevación de los niveles de eosinófilos es frecuente en las parasitosis aunque su papel dista mucho de estar completamente aclarado. Se ha señalado que estas células pueden actuar retrasando el desarrollo parasitario y disminuyendo la eliminación de huevos del helminto en heces (Ashman *et al.*, 1995; Balic *et al.*, 2000b; Terefe *et al.*, 2005). En esta línea nosotros hallamos una elevación en los recuentos, desde la prepatencia, en todos los grupos infestados con *H. contortus*, siendo la eosinofilia superior en los animales inmunizados.

Esta elevación, similar a la observada por Yanming *et al.* (2007) en experimentos vacunales con galectina recombinante, no fue detectada sin embargo por Vervelde *et al.* (2001), en un ensayo de vacunación con antígenos E/S, donde no se apreció alteración en el nivel de los eosinófilos.

Por su parte, el grupo primoinfectado mostró un ligero aumento de los eosinófilos durante la patencia para posteriormente disminuir, lo que parece indicar la existencia de una correlación negativa con el número de huevos eliminados por este grupo. Estos resultados apuntarían al papel que desempeñan los eosinófilos para controlar la parasitación por *H. contortus* además de actuar como marcador en el desarrollo de la resistencia (Patterson *et al.*, 1996; Wanyangu *et al.*, 1997; Hooda *et al.*, 1999; Bricarello *et al.*, 2004; González *et al.*, 2008). En la reinfestación del grupo primoinfectado existió una notable elevación, comparable a la descrita por Mulcahy *et al.* (2004) y Bambou *et al.* (2009), aunque en otras ocasiones no se ha observado ninguna elevación durante las reinfestaciones por *H. contortus* (Adams, 1993; Wilson *et al.*, 1996).

Este comportamiento de los corderos (mayores niveles en animales vacunados y animales infestados + reinfestados), sin embargo no tuvo correspondencia en el análisis individual efectuado ya que no se apreció correlación entre los números de eosinófilos y los niveles de hpg; resultados similares a los descritos por (Gill, 1991; Rainbird *et al.*, 1998; Amarante *et al.*, 1999; Castillo *et al.*, 2011). Parece, por tanto, que nuestros resultados confirman el carácter inconsistente de la eosinofilia periférica solo asociado a la resistencia en determinadas circunstancias (Douch *et al.*, 1996; Woolaston *et al.*, 1996). Es posible, sin embargo, que la determinación de la respuesta celular local pudiera aclarar en el caso de la hemoncosis el papel de los eosinófilos y su relación con la infestación y la resistencia inmunitaria como consecuencia de la primoexposición al helminto o la inmunización artificial.

La respuesta IgG específica anti-*Haemonchus* fue muy ligera durante la primoinfestación de los corderos con el helminto. Como era esperable, no se detectó actividad IgG sérica específica en el grupo testigo, ni frente a ESA, ni frente a la proteína rHc23. Esta escasa elevación observada ha sido descrita en primoinfestaciones con este parásito gástrico (Cuquerella *et al.*, 1994; Gómez- Muñoz *et al.*, 1998,1999; Lacroux *et al.*, 2006) y podría relacionarse con el inóculo parasitario administrado, la

falta de contacto previo con el agente y la edad de los corderos empleados (Cuquerella *et al.*, 1991; Schallig *et al.*, 1994, 1995).

En los animales que habían tenido un contacto previo con el parásito (GVII) se observó un ligero aumento de los niveles de anticuerpos frente ESA, que podría estar relacionado con la capacidad de los animales para adquirir un mayor grado de inmunidad frente al parásito (Maizels y Yazdanbakhsh, 2003). Este aumento ligero, no significativo, tras una reinfestación ha sido hallado en la mayoría de las infestaciones experimentales con *H. contortus* (i.e. Cuquerella *et al.*, 1991; Gómez-Muñoz *et al.*, 1998; Fakae *et al.*, 1999) y no puede ser considerada una respuesta secundaria característica. No obstante, no es posible descartar su posible papel en la expulsión de las larvas o en la regulación del tamaño del helminto y de su fecundidad (Gill *et al.*, 1993a; Amarante *et al.*, 2005). La falta de elevación de los niveles de IgG específica hallados en el grupo de corderos infestados + reinfestados, con significativas reducciones de la carga parasitaria y eliminación de huevos (hpg) sugiere su escaso papel en la protección. Hay que señalar que ESA es una mezcla muy compleja por lo que la estimación de la respuesta sérica es de muy difícil interpretación. Además, probablemente la respuesta inmunitaria protectora desarrollada de forma natural sea mejor evaluada mediante estimaciones locales (abomaso) que en sangre periférica (Gill *et al.*, 1992).

La inmunización con Hc23, tanto nativa como recombinante, provocó un aumento muy notable de los niveles de IgG anti-Hc23 en todos los grupos vacunados, evidencia del éxito de la inmunización efectuada. Hay que señalar que los corderos vacunados con la proteína individual (nativa o recombinante) respondieron, aunque en menor medida a ESA de *H. contortus*, lo que apoya la presencia de Hc23 en el extracto soluble del helminto. El retraso en la elevación de los niveles de IgG anti-Hc23 cuando se empleó como adyuvante una suspensión de *Propionibacterium acnes* inactivado+ lipopolisacáridos de *E. coli* (la elevación se produjo tras la 3ª inoculación de la proteína+adyuvante) parece ser característico de este inmunoestimulante bacteriano (Pappaterra-Mendoza *et al.*, 2000).

El papel de las inmunoglobulinas en el control de las helmintosis intestinales, y en particular, de la hemoncosis es muy controvertido, quizás con la excepción de las inmunizaciones con antígenos ocultos nativos, en los cuales existe una correlación clara

entre el mantenimiento de elevados niveles de anticuerpos y la resistencia inmunitaria de los corderos. Así, por ejemplo, Cachat *et al.* (2010) detectaron un alto nivel de anticuerpos séricos utilizando antígenos, tanto en la forma nativa (H-gal-GP) como recombinante (HC metalo- endopeptidasas MEP1, MEP3 y MEP4); sin embargo, la inmunidad protectora solo se observó cuando se utilizó la proteína nativa en la vacunación.

En numerosos ensayos de vacunación frente a la hemoncosis se han empleado muy diversos tipos de antígenos y todos ellos han provocado el aumento de los niveles de anticuerpos séricos, capaces de reconocer los antígenos inyectados, ya sea en su forma natural o recombinante. Estos resultados, similares a los obtenidos por nosotros, no necesariamente significan que la elevación de los niveles de anticuerpos sean un marcador de resistencia ya que pueden estar implicados, simultáneamente, otros mecanismos efectores de mayor relevancia en el control de la helmintosis.

Se comprobó una mayor inmunodetección de la banda (23 KDa) cuando se electrotransfería la proteína aislada (rHc23) que cuando se empleaba todo el ESA completo. Dichos resultados podrían ser debidos a la menor concentración de la proteína Hc23 dentro del extracto completo del parásito. Ello permitió el reconocimiento de Hc23 por algunos animales (57% de ellos) durante la primoexposición al helminto a pesar de la baja respuesta observada mediante ELISA.

La utilización de los sueros de los animales infestados frente a las proteínas Hc23 y rHc23 (mediante Western blot) evidenció el inmunorreconocimiento de la proteína de 23 KDa a la vez que permitió la detección, más ligera, de una segunda banda antigénica cuyo PM fue de 46 KDa. La presencia de un dímero apunta a la existencia de epítomos inmunogénicos lineales similares entre las dos proteínas; dicha similitud ha sido confirmada mediante proteómica. Además, estos resultados confirman los obtenidos en esta región de PM por Cuquerella *et al.* (1994), Domínguez-Toraño *et al.* (2000) y García-Coiradas *et al.* (2010).

El estudio pormenorizado del inmunorreconocimiento de la banda de 23 KDa por los sueros individuales de los corderos mostró la existencia de variaciones en su detección, relacionadas tanto con el contacto previo de los animales con el parásito como con la fuente antigénica utilizada para la detección. Nuestros resultados apuntan a

que los animales que han tenido un mayor contacto con *H. contortus* fueron capaces de reconocer con mayor intensidad la proteína de 23 KDa (grupo reinfestado) y los animales que mostraron un mayor grado de resistencia frente a la infestación (reducción de hpg, menor carga parasitaria en abomaso) fueron asimismo lo que evidenciaron un inmunorreconocimiento más notable, lo que apunta a un cierto valor de la respuesta de anticuerpos anti-Hc23 en la protección frente a la hemoncosis, así como la gran variabilidad individual en el reconocimiento del helminto (Cuquerella *et al.*, 1994) que podría influir en los diferentes tipos de respuesta que se establecen y, por tanto, en la gravedad de la parasitación que experimentan los distintos corderos al enfrentarse a una infestación con *H. contortus*.

En nuestro estudio, todos los animales incrementaron su peso a lo largo del experimento, ganancia que fue superior en los grupos vacunados, en el grupo reinfestado y en el testigo del estudio, mientras que el grupo primoinfestado mostró una ganancia del peso vivo inferior, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Se ha señalado que *H. contortus* puede interferir en la ganancia en peso de los animales (Hooda *et al.*, 1999), ya sea por la menor ingesta, la utilización inadecuada de nutrientes o la pérdida irreversible de las proteínas y digestión inadecuada (Rahman y Collins, 1990; Fox, 1997; Simpson, 2000). Sin embargo, no parece que la ganancia o pérdida de peso de los corderos sea una estimación adecuada de la infestación por *H. contortus*, salvo en casos extremos de parasitación. Es posible, que experimentos con números superiores de animales muestren que las diferencias favorables obtenidas en los grupos vacunados y en el grupo infestado + reinfestado son significativas.

La observación de que el ganado ovino puede inmunizarse de forma parcial tras las sucesivas infestaciones en el campo de forma natural constituye una evidencia de la capacidad de este ganado para responder adecuadamente a las infestaciones por *H. contortus* e indica, indirectamente, que la inmunoprofilaxis frente a la hemoncosis es una posibilidad real. Así, durante las últimas décadas se han realizado numerosas pruebas de vacunación frente a esta parasitosis con distintos antígenos nativos, adyuvantes y pautas de inmunización, con resultados dispares. Entre ellas, debe destacarse la utilización de la glicoproteína H11 (110 KDa) procedente de las microvellosidades intestinales de L4, preadultos y adultos de *H. contortus* que

aparentemente redujeron la eliminación de huevos en un 90%, con una disminución en el establecimiento de adultos de un 75% (Munn, 1997) e incluso valores de protección superiores cuando se utilizó como adyuvante Quil A (Newton y Munn, 1999). Empleando la misma aproximación (antígenos ocultos) se han utilizado antígenos procedentes de la superficie intestinal del nematodo (complejo de glicoproteínas que contiene galactosa, H-gal-GP); este complejo además, presenta otros componentes como aspartin-cisteinil-metaloproteasas, proteínas similares a la trombospondina, cistatina y galectina, por lo que no queda claro cuál de todas ellas es la responsable de su actividad protectora. En cualquier caso aparentemente redujeron la eliminación de huevos en un 84% y la carga de helmintos adultos en un 61% (Newton y Munn, 1999). Se han utilizado cisteín-proteasas con el fin de alterar la alimentación hematófaga del parásito, un complejo de degradación del fibrinógeno (35-55 KDa), logrando reducciones notables (93% de reducción de huevos, 87% de adultos) (Boisvenue *et al.*, 1992) y proteínas unidas a tioles (TSBP) similares a cathepsina B que han conferido una elevada protección (Newton y Munn, 1999).

De forma similar se han logrado resultados favorables con antígenos expuestos. Así, se ha obtenido una protección parcial en ovejas con antígenos E/S de L4 y adultos del parásito (Hc15/4- Schallig y van Leeuwen, 1997; Bakker *et al.*, 2004) e inmunizaciones con fracciones solubles de bajo PM de *H. contortus* lograron reducciones superiores al 60% (Domínguez-Toraño *et al.*, 2000) o algo inferiores (Alunda *et al.*, 2003).

En nuestras condiciones, la vacunación de corderos de 4-5 meses de edad con la proteína nativa Hc23 ha provocado un notable grado de protección caracterizado por el alargamiento del período prepatente, menor caída del hematocrito, reducciones del 57% y 79% en los valores de hpg (GI y GIII, respectivamente) y reducciones del 69% y 85% en el establecimiento de la carga parasitaria (GI y GIII, respectivamente). Estos resultados confirman la capacidad del sistema inmunitario del ganado ovino de menos de 6 meses para responder frente a *H. contortus* así como la posibilidad de inducir artificialmente una respuesta inmunitaria, siquiera sea parcial. Incidentalmente, ya que en la fracción de bajo PM empleada por Domínguez-Toraño *et al.* (2000) se encontraba probablemente Hc23, nuestro hallazgo confirma sus resultados.

Desgraciadamente, dada la imposibilidad de cultivo de nematodos parásitos y, en particular, *H. contortus*, el empleo de estos antígenos requeriría el mantenimiento constante de infestaciones experimentales con objeto de obtener suficiente material antigénico para las inmunizaciones. Esta limitación es particularmente clara en el caso de Hc23 ya que no ha sido detectada en fases larvarias del helminto. En estas condiciones, tanto por razones éticas como económicas, la producción de la proteína recombinante (rHc23) es un requerimiento; esta aproximación ha sido utilizada asimismo con una variedad de antígenos. Sin embargo, los resultados esperanzadores obtenidos con proteínas nativas no han sido confirmados con proteínas recombinantes (ver Revisión Bibliográfica) con las que los niveles de protección han sido, en general, modestos. Así, distintos antígenos ocultos potencialmente protectores (HAGS) de *H. contortus* han sido clonados y expresados, entre ellos H11 y H-gal-GP (Knox *et al.*, 2003; Smith y Zarlenga, 2006) y utilizados en ensayos. Los resultados obtenidos con estos antígenos recombinantes no indujeron protecciones significativas. En corderos de 5 meses de edad, vacunados con una mezcla de proteínas recombinantes (GST-hmcp 1,4 y 6 proteínas de fusión) solo se obtuvo un 10% de reducción en los valores de hpg y un 38% en la reducción en la carga parasitaria (Redmond y Knox, 2004). En ganado caprino vacunado con galectina recombinante se obtuvo un 37.3%-48.03% de reducción de la eliminación de hpg y un 41.1%-46.19% de reducción en el establecimiento de adultos (Yanming *et al.*, 2007). Niveles similares se han obtenidos con antígenos E/S (rec 15/24) (42-49% de protección en ovejas de 7 a 9 meses de edad) (Schallig y van Leeuwen, 1997) o incluso menores con esta misma preparación en experimentos posteriores (Vervelde *et al.*, 2002).

Para explicar la falta de correlación entre los resultados obtenidos con proteínas nativas y recombinantes se han aducido desde la pérdida de componentes esenciales capaces de inducir una respuesta protectora (i.e., aminopeptidasa, Newton y Meeusen, 2003) a la ausencia de epítomos conformacionales en los productos expresados en *E. coli* (Knox y Smith, 2001), la inadecuada selección del sistema de expresión (sistema eucariótico versus sistema procariótico), renaturalización inadecuada de los antígenos recombinantes o la falta de glicosilación de los productos recombinantes (Dalton *et al.*, 2003).

A pesar de las escasas vacunas antiparasitarias recombinantes algunas eran glicoproteínas en su forma nativa [TickGard (Bm 86) producido en *E. coli* contra

Boophilus microplus (Willadsen *et al.*, 1995), el antígeno T045 recombinante producido en *E. coli* frente a *Taenia ovis* (Rickard *et al.*, 1995; Lightowlers *et al.*, 2003)] y sin embargo han mantenido su eficacia en su forma recombinante. Todo ello apunta a que la posible pérdida de azúcares de las glicoproteínas no es razón suficiente para la falta de actividad de las vacunas recombinantes frente a la hemoncosis que se han desarrollado y han mostrado un escaso o nulo valor protector.

En nuestro ensayo de vacunación con la proteína recombinante rHc23, procedente de una proteína no glicosilada hemos obtenido un grado significativo de protección (reducción > 72-79% en la eliminación fecal de huevos y > del 85% en la población de helmintos de abomaso, grupos GII y GIV).

En el presente ensayo de inmunización con Hc23 hemos utilizado animales de 5 meses de edad, cuyo desarrollo inmunitario también podría estar comprometido (i.e. Smith y Angus, 1980; Vervelde *et al.*, 2001). Se ha señalado que los corderos jóvenes son incapaces de desarrollar una respuesta protectora frente a la hemoncosis apareciendo la madurez inmunitaria más allá de los 8 -10 meses de edad. No obstante, además de en nuestro caso, se han obtenido resultados favorables con antígenos y fracciones antigénicos en corderos de menor edad (i.e. Tavernor *et al.*, 1992a; Smith *et al.*, 1999; Domínguez-Toraño *et al.*, 2000; Knox *et al.*, 2001). Por otra parte, los animales más expuestos en su primera época de pastoreo son jóvenes y es precisamente en ese momento cuando son más propensos a las infestaciones por *H. contortus*. Por ello, la inmunoprotección de animales mayores (> 8 meses) tiene menor interés, ya que como hemos observado en nuestros resultados y en ensayos previos, las reinfestaciones en el campo (y en nuestro caso experimentalmente) actúan por sí mismas como dosis inmunizantes, provocando el desarrollo de resistencia a las infestaciones por tricostrongílidos (Cuquerella *et al.*, 1994; Gauly *et al.*, 2002, entre otros).

García-Coiradas *et al.* (2010) llevaron a cabo un ensayo de vacunación con la proteína recombinante “rHcp26/23” defectiva en hembras manchegas de 3 meses de edad, y a pesar de obtener una respuesta de anticuerpos notable, no se observó ninguna protección. Entre las posibles explicaciones de dicho fallo vacunal podrían incluirse las características propias de los animales (edad y raza del ganado ovino), además del inóculo inmunizante (proteína recombinante/proteína nativa y el adyuvante asociado) y el protocolo de inmunización (Dalton y Mulcahy, 2001; Aguilar y Rodríguez, 2007). La

proteína recombinante (rHc23) utilizada en el presente estudio fue obtenida a partir de un gen del que conocíamos la secuencia completa de nucleótidos; mientras que la proteína recombinante (rHcp26/23) empleada en el ensayo de García-Coiradas *et al.* (2010) era una proteína defectiva, lo que podría provocar los resultados negativos de la inmunización. Además de la edad y del inmunógeno, la falta de protección observada por García-Coiradas *et al.* (2010) podría ser debida a la raza empleada. En nuestro experimento de vacunación empleamos corderos Assaf que se considera una raza resistente aunque menos que la Awasi de la que procede. Respecto a su sensibilidad frente a las NGI (hemoncosis) podría considerarse como una raza sensible a juzgar por los resultados obtenidos, que muestran una elevada eliminación hpg en el grupo primoinfectado, que se correlacionó con una acusada disminución del PCV, además de permitir un alto establecimiento de adultos en el abomaso. Se han descrito grandes diferencias en la sensibilidad-resistencia-resiliencia de distintas razas ovinas (i.e. Black belly, Corriedale, INRA 4000, Dorset) (Wanyangu *et al.*, 1997; Gauly *et al.*, 2002; Bricarello *et al.*, 2004; Getachew *et al.*, 2007). Sin embargo, en un análisis comparativo sobre el comportamiento de animales de razas Manchega y Merina sometidos a una reinfestación (Gómez-Muñoz *et al.*, 1998) apreciaron resultados similares a los nuestros (con corderos Assaf) cuando los animales fueron infestados y reinfestados. Además, Domínguez-Toraño *et al.* (2000) emplearon en ensayos de inmunización, con resultados parcialmente favorables, corderos manchegos, al igual que García-Coiradas *et al.* (2010). Por ello entendemos que la raza empleada no fue responsable del fallo vacunal observado por estos últimos autores. Es probable que la razón de la falta de protección no se deba a una única causa si no que tenga un carácter multifactorial (antígeno defectivo, escasa edad de los corderos empleados, régimen inadecuado de inmunización, adyuvante administrado de forma deficiente, entre otros factores).

La cantidad de proteína que contenía cada inóculo vacunal, en nuestro experimento, fue de 100 µg, dosis similar a la administrada en diversos ensayos [H11 y H-gal-GP - (LeJambre *et al.*, 2008), proteínas de unión a tioles (TSBP) de los adultos de *H. contortus* o cisteína - (Redmond y Knox, 2004)]. Aparentemente se han obtenido mejores resultados con 200 µg de antígeno en el inóculo inmunizante que con 100 µg de galectina recombinante (Yanming *et al.*, 2007) pero consideramos que la dosis de proteínas empleada en nuestro ensayo fue suficiente para inducir una respuesta protectora, como se ha demostrado por la elevación de anticuerpos y la reducción de la

eliminación fecal de huevos (hpg) y carga parasitaria (adultos en abomaso) junto con menores alteraciones fisiológicas observadas, con los dos adyuvantes utilizados.

La elección del adyuvante que formará parte de la inmunización frente a la hemoncosis es un factor esencial ya que puede favorecer el desarrollo de una respuesta inmunitaria protectora o por el contrario provocar tolerancia e incluso inmunosupresión (Newton y Meeusen, 2003; Knox, 2010). En los experimentos de vacunación no utilizamos adyuvante de Freund. Si bien es cierto que la combinación de adyuvante completo de Freund (ACF) y adyuvante incompleto (AIF) induce la activación de la respuesta inmunitaria por las dos vías, Th1 y Th2, particularmente con antígenos hidrosolubles (Cox y Coulter, 1997; Stills, 2005), su empleo produce una respuesta inflamatoria crónica que en ocasiones puede ser grave y dolorosa para el animal, con formación de granulomas en los puntos de inoculación, abscesos estériles y / o necrosis de los tejidos ulcerados (Kleinman *et al.*, 1993; Leenaars *et al.*, 1998). Además, su preparación (correcta emulsión) es crítica (Stills, 2005), pudiendo provocar el efecto contrario al deseado, con un aumento en la población de helmintos adultos y de la eliminación fecal de hpg (Liddell y Knox, 1998). Por estas razones, además de la prohibición de su empleo en vacunas, no consideramos la utilización de este adyuvante en nuestro ensayo de inmunización.

El hidróxido de aluminio es un adyuvante frecuentemente utilizado en ensayos de vacunación, cuyo empleo es tolerable para los animales (no genera lesiones en los puntos de inoculación) a la vez que se muestra eficaz para generar una respuesta inmunitaria. Su eficiencia se ha atribuido a la formación de un depósito en el sitio de la inyección (I/M o S/C) permitiendo la liberación gradual del producto y su exposición más prolongada a las células presentadoras de antígenos y linfocitos (Gupta *et al.*, 1995; Lindblad, 1995); además es un fuerte estimulante de células Th2 y es capaz de generar una fuerte respuesta IgE (Cox y Coulter, 1997). En el caso de la hemoncosis, Jacobs *et al.* (1999) comprobaron la mayor eficacia de hidróxido de aluminio como adyuvante (64% de reducción en hpg) con un antígeno larvario de superficie de *H. contortus*, respecto al empleo de Quil A que no indujo ningún tipo de protección. De forma similar, en un ensayo de vacunación en corderos con glicoproteínas del helminto (Vervelde *et al.*, 2003) obtuvieron una mayor capacidad del hidróxido de aluminio o Alhydrogel (que además de mostrar una respuesta de tipo Th2, provocó reducciones

parasitarias del 89%) respecto al bromuro de dimetil amonio dioctadecil (DDA) que solo fue capaz de inducir un 42% de reducción de la infestación. En otros casos, sin embargo (i.e. cisteín proteasa + Quil A versus cisteín proteasa + hidróxido de aluminio, Geldhof *et al.*, 2004; E/S + hidróxido de aluminio, Bakker *et al.*, 2004) el valor de este adyuvante ha sido muy modesto.

No existe consenso en la comunidad científica sobre la capacidad inmunogénica del hidróxido de aluminio, nuestros resultados apuntan a su validez en vacunaciones de corderos jóvenes frente a la hemoncosis; y en nuestras condiciones asociado a ambas formas proteicas, la proteína Hc23, nativa y recombinante. No obstante, es preciso señalar que aunque el grado de protección logrado con el antígeno nativo fue muy elevado con este adyuvante (69% de reducción de la carga parasitaria en abomaso) este fue ligeramente inferior al obtenido con el adyuvante bacteriano (85% de reducción de la carga parasitaria). El empleo combinado de lipopolisacáridos de *E. coli* y extractos de *Propionibacterium* spp actúa sobre las células presentadoras de antígeno (APC), activando las células dendríticas, las cuales son capaces de inducir una regulación inespecífica sobre el sistema inmunitario del hospedador (Squaiella *et al.*, 2006) que actúa favorablemente en el desarrollo de la respuesta inmunitaria. (Esta asociación bacteriana es considerada como un adyuvante potente y ha sido utilizada en diversas pruebas de vacunación (en inmunizaciones de ratones frente a *Trypanosoma cruzi*, Mussalem *et al.*, 2006). Asimismo se ha comprobado su capacidad como inmunomodulador de la respuesta inmunitaria celular (con proliferación linfocitaria) y humoral (aumento de IgE), durante el curso de una infestación en ovejas parasitadas experimentalmente con *H. contortus* (Abel *et al.*, 2009). En nuestras condiciones, los grupos vacunados con este adyuvante mostraron las mayores reducciones parasitarias (reducción de la carga parasitaria y reducción en los valores de hpg), con independencia de la naturaleza del antígeno (Hc23 nativa o recombinante, rHc23). No se ha determinado el mecanismo efector de esta protección dado el diseño experimental. Por ello, no es posible conocer el papel del inmunoestimulante en la producción de citoquinas (i.e. IL1, IL 2, IL 4, IL 6, IL12 e IFN γ) (Pappaterra-Mendoza *et al.*, 2000; Lo *et al.*, 2009) y son necesarios más ensayos para determinar la respuesta inmunitaria local producida por la inmunización con Hc23.

Las pruebas de inmunización realizadas con Hc23 (nativa y recombinante) y los dos adyuvantes empleados (hidróxido de aluminio, *E. coli* + *P. acnes*) han mostrado un

alto grado de protección frente a la hemoncosis experimental en corderos. Los valores de protección obtenidos fueron comparables a los hallados en los animales sometidos a una primoinfestación + reto parasitario. Sin embargo, la inmunización evitó la muy elevada contaminación parasitaria del medio con huevos del helmineto de los corderos primoinfestados y las alteraciones fisiológicas (i.e. parámetros hemáticos) halladas en los animales infestados.

El empleo de esta vacuna para el control de la hemoncosis podría permitir una disminución de los efectos adversos del helmineto en su primer contacto con el hospedador y a su vez, minimizar los riesgos de contaminación parasitaria, al reducir la eliminación fecal de huevos. Si, además, el antígeno incluido en la unidad vacunal es público, como es el caso de Hc23, se obtendría una inmunización natural de los animales durante el pastoreo, sin necesidad de tener que emplear dosis de recuerdo.

Es más que probable que ninguna vacuna frente a NGI, y en particular frente a *H. contortus*, sea capaz de inducir una inmunidad estéril, similar a la observada en enfermedades infecciosas. Sin embargo, entendemos que Hc23 puede ser una adecuada herramienta epidemiológica, manteniendo niveles bajos de infestación en los animales en pastoreo y, por ello, reduciendo la contaminación de los pastos minimizando el impacto económico de esta parasitosis (Knox, 2010). Un aspecto relevante de los resultados obtenidos es la capacidad de la proteína recombinante (rHc23) para provocar una respuesta protectora, con ambos adyuvantes frente a la hemonchosis. Esta capacidad no ha sido observada hasta la fecha con ninguna proteína recombinante de *H. contortus* y podría permitir, de confirmarse con estudios de campo, la comercialización de la primera vacunación frente a la hemoncosis ovina. Su producción mediante tecnología de ADN recombinante sería de bajo coste y, además, el carácter de “antígeno público” de Hc23 provocaría la revacunación natural de los animales inmunizados en el pasto. En la actualidad, tanto el protocolo de inmunización como la unidad vacunal empleada (Hc23 con ambos adyuvantes) han sido sometidos a la protección de la OEPM con nº de solicitud P201200865.

6. CONCLUSIONES

1. La construcción de una biblioteca genómica de cDNA de adultos de *Haemonchus contortus* y la utilización de una sonda de reconocimiento marcada han permitido la obtención de la secuencia completa del gen que codifica la proteína Hc23.
2. El fraccionamiento de la biblioteca de cADN en 3 secciones de (0.5 Kb hasta 2 Kb, entre 2 y 4 Kb y más de 4 Kb), simplifica la búsqueda, identificación y expresión de proteínas de interés inmunoproláctico e inmunodiagnóstico en la hemoncosis y en otras nematodosis gastrointestinales.
3. La proteína Hc23 muestra una elevada homología con otras proteínas de nematodos aunque su secuencia completa no es coincidente con ninguna presente en las bases de datos.
4. El método desarrollado para la purificación de Hc23 nativa mediante cromatografía de inunioafinidad de extractos solubles de *H. contortus* adultos ha mostrado ser eficaz, rápido y con un elevado rendimiento.
5. La inmunización, de corderos jóvenes de 4-5 meses de edad, con la proteína Hc23 , asociada bien a una combinación bacteriana de *Propionibacterium acnes* inactivado + lipopolisacáridos de *E. coli* o bien utilizando hidróxido de aluminio como adyuvante, ha provocado una protección elevada de los animales frente al reto con *H. contortus*, evidente por la menor eliminación fecal de huevos, inferiores cargas parasitarias en abomaso y ausencia de alteraciones hemáticas notables.
6. Hc23, tanto en su forma nativa como recombinante, indujo una significativa protección frente a la hemoncosis experimental de corderos, de forma especial con el adyuvante bacteriano. Hasta donde conocemos, esta es la primera proteína recombinante capaz de inducir una respuesta protectora frente a las infestaciones por *H. contortus*.
7. La protección lograda con la proteína rHc23 apunta a su interés en la vacunación, a bajo coste, de corderos, reduciendo las alteraciones fisiológicas, la contaminación ambiental por el nematodo y el uso de antihelmínticos en los animales.

7. BIBLIOGRAFÍA

Abel, L. C. J.; Chen, S.; Ricca, L. G.; Martins, M. F.; García, M.; Ananias, R. Z.; Mussalem, J. S.; Squaiella, C. C.; Shaw, R. J. and Longo-Maugéri, I. M. (2009). Adjuvant effect of LPS and killed *Propionibacterium acnes* on the development of experimental gastrointestinal nematode infestation in sheep. Parasite Immunol. 31: 604-612.

Abu-Ghazaleh, R. I.; Fujisawa, T.; Mestecky, J.; Kyle, R. A. and Gleich, G. J. (1989). IgA-induced eosinophil deregulation. J. Immunol. 142: 2393-2400.

Adams, D. B. (1993). Systemic responses to challenge infection with *Haemonchus contortus* in immune Merino sheep. Vet. Res. Commun. 17: 25-35.

Aguilar, J. C. and Rodríguez, E. G. (2007). Vaccine adjuvants revisited. Vaccine. 25: 3752-3762.

Aguilar-Caballero, A. J.; Torres-Acosta, J. F. J. and Sandoval-Castro, C. (2006). Respuesta inmune celular de cabritos criollos infectados artificialmente con *Haemonchus contortus* en Yucatán, México. XXI Reunión Nacional sobre Caprinocultura, AMPCA.A.C. Toluca, México. 4-6 de octubre de 2006.

Alunda, J. M.; Angulo-Cubillán, F. and Cuquerella, M. (2003). Immunization against ovine haemonchosis with three low molecular weight somatic antigens of adult *Haemonchus contortus*. J. Vet. Med. B50: 70-74.

Amarante, A. F. T. and Barbosa, M. P. (1995). Seasonal variations in population of infective larva on pasture and nematode fecal egg output in sheep. Vet. Zoot. 7: 127-133.

Amarante, A. F. T.; Bricarello, P. A.; Huntley, J. F.; Mazzolin, L. P. and Gomes, J. C. (2005). Relationship of abomasal histology and parasite-specific immunoglobulin A with the resistance to *Haemonchus contortus* infection in three breeds of sheep. Vet. Parasitol. 128: 99-107.

Amarante, A. F. T.; Bricarello, P. A.; Rocha, R. A. and Gennari, S. M. (2004). Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France sheep to naturally acquired gastrointestinal infections. Vet. Parasitol. 120: 91-106.

Amarante, A. F. T.; Craig, T. M.; Ramsey, W. S.; Davis, S. K. and Bazer, F. W. (1999). Nematode burdens and cellular responses in the abomasal mucosa and blood of Florida Native, Rambouillet and Crossbred lambs. Vet. Parasitol. 80: 311-324.

Andrews, S. J.; Hole, N. J.; Munn, E. A. and Rolph, T. P. (1995). Vaccination of sheep against haemonchosis with H11, a gut membrane-derived protective antigen from the adult parasite: prevention of the periparturient rise and colostral transfer of protective immunity. Int. J. Parasitol. 25: 839-846.

Andrews, S. J.; Rolph, T. P.; Munn, E. A. and Taylor, M. A. (1997). Duration of protective immunity against ovine haemonchosis following vaccination with the nematode gut membrane antigen H11. Res. Vet. Sci. 62: 223-227.

- Ashman, K.; Mather, J.; Wiltshire, O.; Jacobs, H. J. and Meeusen, E. N. T. (1995). Isolation of a larval surface glycoprotein from *Haemonchus contortus* and its possible role in evading host immunity. Mol. Biochem. Parasitol. 70:175-179
- Aumont, G.; Gruner, L. and Hostache, G. (2003). Comparison of the resistance to sympatric and allopatric isolates of *Haemonchus contortus* of Black Belly sheep in Guadeloupe (FWI) and of INRA 401 sheep in France. Vet. Parasitol. 116: 139-150.
- Aumont, G.; Pouillot, R.; Simon, R.; Hostache, G.; Varo, H. and Barré, N. (1997). Parasitisme difestif des petits ruminants dans les Antilles Françaises. INRA Prod. An. 10: 79-90.
- Bain, R. K. and Urquhart, G. M. (1988). Parenteral vaccination of calves against the cattle lungworm *Dictyocaulus viviparus*. Res. Vet. Sci. 45: 270-271.
- Baker, R. L. (1997). Résistance génétique des petits ruminants aux helminthes en Afrique. INRA Prod. An. 10: 99-110.
- Bakker, N.; Vervelde, L.; Kanobana, K.; Knox, D. P.; Cornelissen, A. W. C. A.; de Vries, E. and Yatsuda, A. P. (2004). Vaccination against the nematode *Haemonchus contortus* with a thiol-binding fraction from the excretory/ secretory products (ES). Vaccine. 22: 618-628.
- Balic, A.; Bowles, V. M. and Meeusen, E. N. T. (2000a). The immunobiology of gastrointestinal nematode infections in ruminants. Adv. Parasitol. 45: 181-241.
- Balic, A.; Bowles, V. M. and Meeusen, E. N. T. (2000b). Cellular profiles in the abomasal mucosa and lymph node during primary infection with *Haemonchus contortus* in sheep. Vet. Immunol. Immunopathol. 75: 109-120.
- Balic, A.; Bowles, V. M. and Meeusen, E. N. T. (2002). Mechanisms of immunity to *Haemonchus contortus* infection in sheep. Parasite Immunol. 24: 39-46.
- Balic, A.; Cunningham, C. P. and Meeusen, E. N. T. (2006). Eosinophil interactions with *Haemonchus contortus* larvae in the ovine gastrointestinal tract. Parasite Immunol. 28: 107-115.
- Bambou, J. C.; Arquet, R.; Archimède, H.; Alexandre, G.; Mandonnet, N. and González-García, E. (2009). Intake and digestibility of naïve kids differing in genetic resistance and experimentally parasitized (indoor) with *Haemonchus contortus* in two successive challenges. J. Animal Sci. 87: 2367-2375.
- Barnes, E. H.; Dobson, R. J. and Barger, I. A. (1995). Worm control and anthelmintic resistance: adventures with a model. Parasitol. Today. 11: 56-63.
- Bendixsen, T.; Emery, D. L. and Jones, W. O. (1995). The sensitization of mucosal mast cell during infections with *Trichostrongylus colubriformis* or *Haemonchus contortus* in sheep. Int. J. Parasitol. 25: 741-748.
- Bisset, S. A.; Vlassoff, A.; Douch, P. G. C.; Jonas, W. E.; West, C. J. and Green, R. S. (1996). Nematode burdens and immunological responses following natural challenge in Romney lambs selectively breed for low or high faecal egg count. Vet. Parasitol. 61: 249-263.

- Boisvenue, R. J.; Stiff, M. I.; Tonkinson, L.V. and Cox, G. N. (1991). Protective studies in sheep immunized with cuticular collagen proteins and peptides of *Haemonchus contortus*. Parasite Immunol. 13: 227-240.
- Boisvenue, R. J.; Stiff, M. I.; Tonkinson, L.V.; Cox, G. N. and Hageman, R. (1992). Fibrinogen-degrading proteins from *Haemonchus contortus* used to vaccinate sheep. Am. J. Vet. Res. 53: 1263-1265.
- Bora, N. S.; Bora, P. S. and Kaplan, H. J. (1996). Identification, quantitation, and purification of a 36 kDa circulating protein associated with active pars planitis. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 37: 1870-1876.
- Bowman, D. D.; Lynn, R. C. and Eberhard, M. L. (2002). Helminths. In: Saunders, W. (Ed.), *Georgis' Parasitology for the Veterinarians*. Harcourt Health Sciences Company, New York, pp 162-163,264,268-269,273,380.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Annals Biochem. 72: 248-254.
- Bradley, R. E.; Radhakrishnan, C. V.; Patilkulkarni, V. G. and Loggins, P. E. (1973). Responses in Florida Native and Rambouillet lambs exposed to one or two oral doses of *Haemonchus contortus*. Am. J. Vet. Res. 34: 729-735.
- Bricarello, P. A.; Gennari, S. M.; Oliveiera-Sequeira, T. C. G.; Vaz, C. M. S. L.; Goncalves de Goncalves, I. and Echevarria, F. A. M. (2004). Worm burden and immunological responses in Corriedale and Crioula Landa sheep following natural infection with *Haemonchus contortus*. Small ruminant Res. 51: 75-83.
- Buddle, B. M.; Jowett, G.; Green, R. S.; Douch, P. G. C. and Risdon, P. L. (1992). Association of blood eosinophilia with the expression of resistance in Romney lambs to nematodes. Int. J. Parasitol. 22: 955-960.
- Cachat, E.; Newlands, G. F. J.; Ekoja, S. E.; McAllister, H. and Smith, W. D. (2010). Attempts to immunize sheep against *Haemonchus contortus* using a cocktail of recombinant proteases derived from the protective antigen, H-gal-GP. Parasite Immunol. 32: 414-419.
- Campbell, T. N. and Choy, F. Y. M. (2002). Approaches to Library Screening. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 4: 551-554.
- Cantacessi, C.; Campbell, B. E.; Young, N. D.; Jex, A. R.; Hall, R. S.; Presidente, P. JA.; Zawadzki, J. L.; Zhong, W.; Aleman-Meza, B.; Loukas, A.; Sternberg, P. W. and Gasser, R. B. (2010). Differences in transcription between free-living and CO₂-activated third-stage larvae of *Haemonchus contortus*. BMC Genomics. 11: 266-279.
- Carson, M.; Johnson, D. H.; McDonald, H.; Brouillette, C. and Delucas, L. J. (2007). His-tag impact on structure. Acta. Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 63: 295-301.
- Castillo, J. A.; Medina, R. D.; Villalobos, J. M.; Gayosso-Vázquez, A.; Ulloa-Arvizu, R.; Rodríguez, R. A.; Ramírez, H. P. and Morales, R. A. (2011). Association between major histocompatibility complex microsatellites, fecal egg count, blood packed cell volume and blood eosinophilia in Pelibuey sheep infected with *Haemonchus contortus*. Vet. Parasitol. 177:339-344.

- Cheng, J.; Hicks, D. B. and Krulwich, T. A. (1996). The purified *Bacillus subtilis* tetracycline efflux protein TetA(L) reconstitutes both tetracycline-cobalt/H⁺ and Na⁺/K⁺/H⁺ exchange. Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 14446–14451.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical Biochem. 162: 156-159.
- Coffman, R. L.; Seymour, B. W. P.; Hudak, S.; Jackson, J. and Rennik, D. (1989). Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. Sci. 245: 308-310.
- Coop, R. L. and Kyriazakis, L. (2001). Influence of host nutrition on the development and consequences of nematode parasitism in ruminants. Trends Parasitol. 17: 325- 330.
- Courtney, C. H.; Parker, C. F.; McClure, K. E. and Herd, R. P. (1985). Resistance of exotic and domestic lambs to experimental infection with *Haemonchus contortus*. Int. J. Parasitol. 15: 101-109.
- Cox, F. E. G. (1993). Modern Parasitology, 2nd Ed.; Black well Scientific Publications, Oxford, pp 276.
- Cox, G. N.; Pratt, D.; Hageman, R.; and Boisvenue, R. J. (1990). Molecular cloning and primary sequence of a cysteine protease expressed by *Haemonchus contortus* adult worms. Mol. Biochem. Parasitol. 41: 25-34.
- Cox, J. C. and Coulter, A. R. (1997). Adjuvants-a classification and review of the modes of action. Vaccine. 15: 248-256.
- Creaney, J.; Wijffels, G.; Sexton, J.; Sandeman, R. M.; Spithill, T. W. and Parsons, J. C. (1995). *Fasciola hepatica*: localisation of glutathione S-transferase isoenzymes in adult and juvenile liver fluke. Exp. Parasitol. 81: 106–116.
- Cuquerella, M.; Gómez-Muñoz, M. T. and Alunda, J. M. (1991). Serum IgG response of Manchego lambs to infections with *Haemonchus contortus* and preliminary characterization of adult antigens. Vet. Parasitol. 38: 131-143.
- Cuquerella, M.; Gómez-Muñoz, M. T.; de la Fuente, C.; Carrera, L. and Alunda, J. M. (1993). Lamb serum recognition of infective larvae and adult *Haemonchus contortus* antigens. Vet. Parasitol. 49: 255-264.
- Cuquerella, M.; Gómez-Muñoz, M. T.; Méndez, S. and Alunda, J. M. (1994). Partial protection of Manchego sheep against *Haemonchus contortus* after a 6-month postpriming Period. Preliminary Note. J. Vet. Med. B 41: 399–406.
- Dalton, J. P. and Mulcahy, G. (2001). Parasite vaccines – a reality? Vet. Parasitol. 98: 149-167.
- Dalton, J. P.; Brindley, P. J.; Knox, D. P.; Brady, C. P.; Hotez, P. J.; Donnelly, S.; O'Neill, S. M.; Mulcahy, G. and Loukas, A. (2003). Helminth vaccines: from mining genomic information for vaccine targets to systems used for protein expression. Int. J. Parasitol. 33: 621-640.

- Dalton, J. P.; Clough, K. A.; Jones, M. K. and Brindley, P. J. (1996). Characterization of the cathepsin-like cysteine proteinases of *Schistosoma mansoni*. Infect. Immun. 64: 1328–1334.
- Dawkins, H. J. S.; Windon, R. G. and Eagleson, G. K. (1989). Eosinophils responses in sheep selected for high and low response to *Trichostrongylus colubriformis*. Int. J. Parasitol. 19: 199-205.
- de Veer, M. J.; Kemp, J. M. and Meeusen, E. N. T. (2007). The innate host defense against nematode parasites. Parasite Immunol. 29: 1-9.
- Di Loria, A.; Veneziano, V.; Piantedosi, D.; Rinaldi, L.; Cortese, L.; Mezzino, L.; Cringoli, G. and Ciaramella, P. (2009). Evaluation of the FAMACHA system for detecting the severity of anaemia in sheep from southern Italy. Vet. Parasitol. 161: 53-59.
- Domínguez-Toraño, I. A.; Cuquerella, M.; Gómez-Muñoz, M. A. T.; Méndez, S.; Fernández-Pérez, F. J. and Alunda, J. M. (2000). Vaccination of Manchego lambs against *Haemonchus contortus* with a somatic fraction (p26/23) of adult parasites. Parasite Immunol. 22: 131–138.
- Dorny, P.; Batubara, A.; Iskander, M. and Pandey, V. (1996). Helminth infections of sheep in north Sumatra, Indonesia. Vet. Parasitol. 61: 353-358.
- Douch, P. G.; Green, R. S. and Risdon, P. L. (1994). Antibody responses of sheep to challenge with *Trichostrongylus colubriformis* and the effect of dexamethasone treatment. Int. J. Parasitol. 24: 921-928.
- Douch, P. G.; Green, R. S.; Morris, C. A.; McEewan, J. C. and Windon, R. G. (1996). Phenotypic markers for selection of nematode resistant sheep. Int. J. Parasitol. 26: 899-911.
- Draper, M. P.; August, P. R.; Connolly, T.; Packard, B. and Call, K. M. (2002). Efficient cloning of full-length cDNAs based on cDNA size fractionation. Genomics. 79: 603-607.
- Dubucquoi, S.; Desreumaux, P.; Janin, A.; Klein, O.; Goldman, M.; Tavernier, J.; Capron, A. and Capron, M. (1994). Interleukin 5 synthesis by eosinophils: association with granules and immunoglobulin dependent secretion. J. Exp. Med. 179: 703-708.
- Ducray, P.; Gauvry, N.; Pautrat, F.; Goebel, T.; Fruechtel, J.; Desales, Y.; Weber, S. S.; Bouvier, J.; Wagner, T.; Froelich, O. and Kaminsky, R. (2008). Discovery of amino-acetonitrile derivatives, a new class of synthetic anthelmintic compounds. Bioorg. Med. Chem. Lett. 18: 2935–2938.
- Dunphy, J. L.; Barcham, G. J.; Bischof, R. J.; Young, A. R.; Nash, A. and Meeusen, E. N. T. (2002). Isolation and characterization of a novel eosinophil-specific galectin released into the lungs in response to allergen challenge. J. Biol. Chem. 277: 14916–14924.
- Echevarria, F. A. M.; Borba, M. F. S.; Pinheiro, A. C.; Waller, P. J. and Hansen, J. W. (1996). The prevalence of anthelmintic resistance in nematodes parasite of sheep in Southern Latin America, Brazil. Vet. Parasitol. 62: 199-206.

- Eckert, J. and Hertzberg, H. (1994). Parasite control in transhumant situations. Vet. Parasitol. 54: 103-125.
- Egan, M. A. and Israel, Z. R. (2002). The use of cytokines and chemokines as genetic adjuvants for plasmid DNA vaccines. Clin. Applied Immunol. Rev. 2: 255-287.
- Else, K. J. and Finkelman, F. D. (1998). Intestinal nematode parasites, cytokines and effector mechanisms. Int. J. Parasitol. 28: 1145–1158.
- Emery, D. L.; McClure, S. J. and Davey, R. J. (2000). Protection of Merino lambs against *Haemonchus contortus* by trickle infection of neonates. Parasitol. Int. 49: 165-170.
- Emery, D. L.; McClure, S. J.; Wagland, B. M. and Jones, W. O. (1992). Studies of stage-specific immunity against *Trichostrongylus colubriformis* in sheep: immunization by normal and truncated infections. Int. J. Parasitol. 22: 215-220.
- Emery, D. L.; Wagland, B. M. and McClure, S. J. (1993). Rejection of heterologous nematodes by sheep immunized with larval or adult *Trichostrongylus colubriformis*. Int. J. Parasitol. 23: 841-846.
- Eysker, M. and Ploeger, H. W. (2000). Value of present diagnostic methods for gastrointestinal nematode infections of ruminants. Parasitol. 120: 109-119.
- Fakae, B. B.; Chiejina, S. N.; Behnke, J. M.; Ezeokonkwo, R. C.; Nnadi, P. A.; Onyenwe, W. I.; Gilbert, F. S. and Wakelin, D. (1999). The response of Nigerian West African Dwarf goats to experimental infections with *Haemonchus contortus*. Res. Vet. Sci. 66: 147-158.
- Fetterer, R. H. and Rhoads, M. L. (1998). A haemolytic factor from *Haemonchus contortus* alters erythrocyte morphology. Vet. Parasitol. 80: 37-45.
- Fleming, S.; Craig, T.; Kaplan, R. M.; Miller, J. E.; Navarre, C. and Rings, M. (2006). Anthelmintic resistance of gastrointestinal parasites in small ruminants. J. Vet. Int. Med. 20: 435-444.
- Fox, M. T. (1997). Pathophysiology of infection with gastrointestinal nematodes in domestic ruminants: recent developments. Vet. Parasitol. 72: 285-308.
- Fox, M. T. and Jacobs, D. E. (1991). Blood gastrin and Pepsinogen responses of native village goats in Malaysia to infection with *Haemonchus contortus*. Ann. Trop. Med. Parasitol. 85: 263- 267.
- Fox, M. T.; Pitt, S. R.; Gerrelli, D.; Jacobs, D. E.; Adhikari, D. R. and Goddard, P. J. (1988). Use of blood gastrin assay in the diagnosis of ovine haemonchosis. Vet. Rec. 122: 136-137.
- Gamble, H. R. and Zajac, A. M. (1992). Resistance of St. Croix lambs to *Haemonchus contortus* in experimentally and naturally acquired infections. Vet. Parasitol. 41: 211–225.
- García-Coiradas, L.; Angulo-Cubillán, F.; Méndez, S.; Larraga, V.; de la Fuente, C.; Cuquerella, M. and Alunda, J. M. (2009). Isolation and immunolocalization of a

putative protective antigen (p26/23) from adult *Haemonchus contortus*. Parasitol. Res. 104: 363-369.

García-Coiradas, L.; Angulo-Cubillán, F.; Valladares, B.; Martínez, E.; de la Fuente, C.; Alunda, J. and Cuquerella, M. (2010). Immunization against lamb haemonchosis with a recombinant somatic antigen of *Haemonchus contortus* (rHcp26/23). Vet. Med. Int. 2010: 1-8.

García-García, J. C.; Montero, C.; Redondo, M.; Vargas, M.; Canales, M.; Boue, O.; Rodríguez, M.; Joglar, M.; Machado, H.; González, I. L.; Valdés, M.; Méndez, L.; de la Fuente, J. (2000). Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. Vaccine. 18: 2275–2287.

Gatongi, P. M.; Prichard, R. K.; Ranjan, S.; Gathuma, J. M.; Munyua, W. K.; Cheruiyot, H. and Scott, M. E. (1998). Hypobiosis of *Haemonchus contortus* in natural infection of sheep and goats in a semi-arid area of Kenya. Vet. Parasitol. 77: 49-61.

Gauly, M.; Kraus, M.; Vervelde, L.; van Leeuwen, M. A. W. and Erhardt, G. (2002). Estimating genetic differences in natural resistance in Rhön and Merinoland sheep following experimental *Haemonchus contortus* infection. Vet. Parasitol. 106: 55-67.

Gauly, M.; Schackert, M.; Hoffmann, B. and Erhardt, G. (2006): Influence of sex on the resistance of sheep lambs to an experimental *Haemonchus contortus* infection. Dtsch. Tierarztl. Wochenschr. 113: 178–181.

Gause, W. C.; Urban, Jr. J. F. and Stadecker, M. J. (2003). The immune response to parasitic helminths: insights from murine models. Trends Immunol. 24: 269–277.

Geldhof, P.; Vercauteren, I.; Vercruysse, J.; Knox, D. P.; van Den Broeck, W. and Claerebout, E. (2004). Validation of the protective *Ostertagia ostertagi* ES-thiol antigens with different adjuvantia. Parasite Immunol. 26: 37-43.

Getachew, T.; Dorchies, P. and Jacquet, P. (2007). Trends and challenges in the effective and sustainable control of *Haemonchus contortus* infection in sheep. Rev. Parasite. 14: 3-14.

Gibbons, L. M. (1979). Revision of the genus *Haemonchus* Cobb, 1898 (Nematoda: Trichostrongylidae). Systematic Parasitol. 1: 3–24.

Gill, H. S. (1991). Genetic control of acquired resistance to haemonchosis in Merino lambs. Parasite Immunol. 13: 617-628.

Gill, H. S.; Altmann, K.; Cross, M. L. and Husband, A. J. (2000). Induction of T helper 1- and T helper 2-type immune responses during *Haemonchus contortus* infection in sheep. Immunol. 99: 458–463.

Gill, H. S.; Gray, G. D.; Watson, D. L. and Husband, A. J. (1993a). Isotype-specific antibody responses to *Haemonchus contortus* in genetically resistant sheep. Parasite Immunol. 15: 61-67.

Gill, H. S.; Watson, D. L. and Brandon, M. R. (1992). In vivo inhibition by a monoclonal antibody to CD4+ T cells of humoral and cellular immunity in sheep. Immunol. 77: 38–42.

- Gill, H. S.; Watson, D. L. and Brandon, M. R. (1993b). Monoclonal antibody to CD4- T cells abrogates genetic resistance to *Haemonchus contortus* in sheep. Immunol. 78: 43-49.
- Gómez-Muñoz, M. T.; Cuquerella, M. and Alunda, J. M. (1996). Identification and partial purification of a 26 kilodalton antigen of adult *Haemonchus contortus*. Int. J. Parasitol. 26: 311–318.
- Gómez-Muñoz, M. T.; Cuquerella, M.; de la Fuente, C.; Gómez-Iglesias, L. A. and Alunda, J. M. (1998). Infection induced protection against *Haemonchus contortus* in Merino and Manchego sheep. Relationship to serum antibody response. J. Vet. Med. B45: 449-459.
- Gómez-muñoz, M. T.; Cuquerella, M.; Gómez-Iglesias, L. A.; Méndez, S.; Fernández-Pérez, F. J.; de la Fuente, C. and Alunda, J. M. (1999). Serum antibody response of Castellana sheep to *Haemonchus contortus* infection and challenge: relationship to abomasal worm burdens. Vet. Parasitol. 81: 281-293.
- Gómez-Muñoz, M. T.; Gómez-Iglesias, L. A.; Fernández-Pérez, F. J.; Méndez, S.; Domínguez, I. A.; de la Fuente, C.; Alunda, J. M. and Cuquerella, M. (2001). Experimental *Haemonchus contortus* infection and challenge in the Churra sheep breed: immunological and pathophysiological parameters. Revista ibérica de parasitología. 61: 83-89.
- González, J. F.; Hernández, A.; Molina, J. M.; Fernández, A.; Raadsma, H. W.; Meeusen, E. N. T. and Piedrahita, D. (2008). Comparative experimental *Haemonchus contortus* infection of two sheep breeds native to Canary Island. Vet. Parasitol. 153: 374-378.
- Graham, M.; Smith, T. S.; Munn, E. A.; Knox, D. P.; Oliver, J. J. and Newton, S. E. (1994). Recombinant DNA molecules encoding aminopeptidase enzymes and their use in the preparation of vaccines against helminth infections. Patent Application, PCT/GB93/00943.
- Gray, G. D. (1997). The use of genetically resistant sheep to control nematode parasitism. Vet. Parasitol. 72: 345-366.
- Grencis, R. K. (2001). Cytokine regulation of resistance and susceptibility to intestinal nematode infection—from host to parasite. Vet. Parasitol. 100: 45–50.
- Gross, S. J.; Ryan, W. G. and Ploegar, H. W. (1999). Anthelmintic treatment of dairy cows and its effect on milk production. Vet. Rec. 144: 581-587.
- Gupta, R. K.; Rost, B. E.; Relyveld, E. and Siber, G. R. (1995). Adjuvant properties of aluminium and calcium compounds, p. 229–248. In M. F. Powell and M. J. Newman (ed.), Vaccine design: the subunit and adjuvant approach. Plenum Press, New York, N.Y.
- Haig, D. M.; Windon, R.; Blackie, W.; Brown, D. and Smith, W. D. (1989). Parasite-specific T cell responses of sheep following live infection with the gastric nematode *Haemonchus contortus*. Parasite Immunol. 11:463-477.
- Harrison, G. B.; Heath, D. D.; Dempster, R. P.; Gauci, C.; Newton, S. E.; Cameron, W.G.; Robinson, C. M.; Lawrence, S. B.; Lightowlers, M. W. and Rickard, M. D.

- (1996). Identification and cDNA cloning of two novel low molecular weight host-protective antigens from *Taenia ovis* oncospheres. Int. J. Parasitol. 26: 195-204.
- Harrison, G. B.; Pulford, H. D.; Hein, W. R.; Barber, T. K.; Shaw, R. J.; McNeill, M.; Wakefield, S. T. J. and Shoemaker, C. B. (2003). Immune rejection of *Trichostrongylus colubriformis* in sheep; a possible role for intestinal mucus antibody against an L3-specific surface antigen. Parasite Immunol. 25: 45-53.
- Hartman, D.; Cottee, P. A.; Savin, K. W.; Bhawe, M.; Presidente, P. J.; Fulton, L.; Walkiewicz, M. and Newton, S. E. (2003). *Haemonchus contortus*: molecular characterisation of a small heat shock protein. Exp. Parasitol. 104: 96-103.
- Hein, W. R. and Mackay, C. R. (1991). Prominence of gamma delta T cells in the ruminant immune system. Immunol. Today. 12: 30-34.
- Hendrikx, W. M. (1990). De nematode *Haemonchus contortus*: antigeenkarakter en immuunrespons bij konijnen en schapen. Tijdschr Diergeneesk. 115: 1092-1101.
- Hertzberg, H. and Bauer, C. (2000). Anthelmintika Resistenzen bei Magen- Darm-Strongyliden Von Schafen und Ziegen: Aktuelles über verbreitung. Epidemiologie, Voreugema Bnahmen und alternative Zum Anthelmintika-Einsatz. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 113: 122-128.
- Herve, C. and Sarrouilhe, D. (2005). Connexin-made channels as pharmacological targets. Curr. Pharm. Des. 11: 1941-1958.
- Hooda, V.; Yadav, C. L.; Chaudhri, S. S.; Rajpurohit, B. S. (1999). Variation in resistance to haemonchosis: selection of female sheep resistant to *Haemonchus contortus*. J. Helminthol. 73: 137-142.
- Hoste, H. (2001). Adaptive physiological processes in the host during gastrointestinal parasitism. Int. J. Parasitol. 31: 231-244.
- Hoste, H.; Le Frileux, Y. and Pommaret, A. (2002). Comparison of selective and systematic treatments to control nematode infection of the digestive tract in dairy goats. Vet. Parasitol. 106: 345-355.
- Hoste, H.; Torres-Acosta, J. F.; Paolini, V.; Aguilar-Caballero, A. J.; Etter, E.; Lefrileux, Y.; Chartier, C. and Broqua, C. (2005). Interactions between nutrition and gastrointestinal infections with parasitic nematodes in goats. Small. Rumin. Res. 60: 141-151.
- Hunt, P. W.; Knox, M. R.; LeJambre, L. F.; McNally, J. and Anderson, L. J. (2008). Genetic and phenotypic differences between isolated *Haemonchus contortus* in Australia. Int. J. Parasitol. 38: 885-900.
- Hunter, A. R. and MacKenzie, G. (1982). The pathogenesis of a single challenge dose of *Haemonchus contortus* in lambs under six months of age. J. Helminthol. 56: 135-144.
- Huntley, J. F.; Newlands, G. and Miller, H. R. P. (1984). The isolation and characterization of globule leucocytes: their derivation from mucosal mast cells in parasitized sheep. Parasite Immunol. 6: 371-390.

- Huntley, J. F.; Newlands, G.; Jackson, F. and Miller, H. R. P. (1992). The influence of challenge dose, duration of immunity or steroid treatment on mucosal mast cells and on distribution of sheep mast cell proteinase in *Haemonchus* infected sheep. Parasite Immunol. 14: 429-440.
- Huntley, J. F.; Redmond, J.; Welfare, W.; Brennan, G.; Jackson, F.; Kooyman, F. and Vervelde, L. (2001). Studies on the immunoglobulin E responses to *Teladorsagia circumcincta* in sheep: purification of a major high molecular weight allergen. Parasite Immunol. 23: 227-235.
- Huntley, J. F.; Schallig, H. D.; Kooyman, F. N.; Mackellar, A.; Jackson, F. and Smith, W. D. (1998). IgE antibody during infection with the ovine abomasal nematode, *Teladorsagia circumcincta*: primary and secondary responses in serum and gastric lymph of sheep. Parasite Immunol. 20: 565-571.
- Huntley, J. F.; van den Broek, A.; Machell, J. (2005). The effect of immunosuppression with cyclosporin A on the development of sheep scab. Vet. Parasitol. 127: 323-332.
- Jackson, F. and Coop, R. L. (2000). The development of anthelmintic in sheep nematodes. Parasitol. 120: S95-S107.
- Jackson, F.; Miller, H. R. P.; Newlands, G. J. F.; Wright, S. E. and Hay, L. A. (1988). Immune exclusion of *Haemonchus contortus* larvae in sheep: dose dependency, steroid sensitivity and persistence of the response. Res. Vet. Sci. 44: 320-323.
- Jacobs, H. J.; Wiltshire, C.; Ashman, K. and Meeusen E. N. T. (1999). Vaccination against the gastrointestinal nematode, *Haemonchus contortus*, using a purified larval surface antigen. Vaccine. 17: 362-368.
- Jacquiet, P.; Humbert, J. F.; Comes, A. M.; Cabaret, J.; Thiam, A. and Cheikh, D. (1995). Ecological, morphological and genetic characterization of sympatric *Haemonchus* spp. parasites of domestic ruminants in Mauritania. Parasitol. 110: 483-492.
- Jasmer, D. P. and McGuire, T. C. (1991). Protective immunity to a blood-feeding nematode (*Haemonchus contortus*) induced by parasite gut antigens. Infect. Immun. 59: 4412-4417.
- Kahiya, C.; Mukaratiwa, S. and Thamsborg, S. M. (2003). Effects of Acacia karroo and Acacia nilotica diets on *Haemonchus contortus* infection in goats. Vet. Parasitol. 115: 265-274.
- Kaminsky, R. (2003). Drug resistance in nematodes: a paper tiger or a real problem? Curr. Opin. Infect. Dis. 16: 559-564.
- Kaminsky, R.; Gauvry, N.; Weber, S. S.; Skripsky, T.; Bouvier, J.; Wenger, A.; Schroeder, F.; Desaulles, Y.; Hotz, R.; Goebel, T.; Hosking, B. C.; Pautrat, F.; Wieland-Berghausen, S. and Ducray, P. (2008). Identification of the amino-acetonitrile derivative monepantel (AAD 1566) as a new anthelmintic drug development candidate. Parasitol. Res. 103: 931-939.
- Kaplan, R. M. (2004). Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. Trends Parasitol. 20: 476-481.

- Karanu, F. N.; McGuire, T.; Davis, W. C.; Besser, T. E. and Jasmer, D. P. (1997). CD4+ T lymphocytes contribute to protective immunity induced in sheep and goats by *Haemonchus contortus* guts antigens. Parasite Immunol. 19:435–445.
- Kassai, T. (2002). Helmintología Veterinaria. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. PP. 163-180.
- Kästner, C. N.; Dimroth, P. and Pos, K. M. (2000). The Na⁺ dependent citrate carrier of *Klebsiella pneumoniae*: High-level expression and site-directed mutagenesis of asparagines-185 and glutamate-194. Arch. Microbiol. 174: 67–73.
- Khan, M. Q.; Hayat, C. S.; Ilyas, M.; Hussain, M. and Iqbal, Z. (1988). Effect of haemonchosis on body weight gain and blood values in sheep. Pak. Vet. J. 8:62-67.
- Khan, W. I. and Collins, S. M. (2004). Immune-mediated alteration in gut physiology and its role in host defense in nematode infection. Parasite Immunol. 26: 319-326.
- Klein, S. L. (2000a). The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior. Neurosci. Biobehav. Rev. 24: 627-638.
- Klein, S. L. (2000b). Hormones and mating system affect sex and species differences in immune infection among vertebrates. Behav. Processes. 5: 149-166.
- Kleinman, N. R.; Kier, A. B.; Diaconu, E. and Lass, J. H. (1993). Posterior paresis induced by Freund's adjuvant in guinea pigs. Lab. Anim. Sci. 43: 364-366.
- Klesius, P. H.; Washburn, S. M.; Ciordia, H. and Haynes, T. B. (1984). Lymphocyte reactivity to *Ostertagia ostertagi* L3 antigen in type 1 ostertagiasis. Am. J. Vet. Res. 45: 230-233.
- Klion, A. D. and Nutman, T. B. (2004). The role of eosinophils in host defense against helminth parasites. J. Allerg. Clinic. Immunol. 113: 30-37.
- Knox, D. P. (2010). Parasite Vaccines: Recent Progress in, and Problems Associated with their Development. The Open Infect. Dis. J. 4: 63-73.
- Knox, D. P. and Smith, W. D. (2001). Vaccination against gastrointestinal nematode parasites of ruminants using gut-expressed antigens. Vet. Parasitol. 100: 21–32.
- Knox, D. P.; Redmon, D. L. and Jones D. J. (1993). Characterization of proteinase in extracts of adults *Haemonchus contortus*, the ovine abomasal nematode. J. Parasitol. 106: 395-404.
- Knox, D. P.; Redmond, D. L.; Newlands, G. F.; Skuce, P. J.; Pettit, D. and Smith, W. D. (2003). The nature and prospects for gut membrane proteins as vaccine candidates for *Haemonchus contortus* and other ruminant trichostrongyloids. Int. J. Parasitol. 33: 1129-1137.
- Knox, D. P.; Redmond, D. L.; Skuce, P. J. and Newlands, G. F. J. (2001). The contribution of molecular biology to the development of vaccines against nematode and trematode parasites of domestic ruminants. Vet. Parasitol. 101: 311-335.

- Knox, D. P.; Smith, S. K. and Smith, W. D. (1999). Immunization with an affinity purified protein extract from the adult parasite protects lambs against infection with *Haemonchus contortus*. Parasite Immunol. 21: 201–210.
- Komoin, O. C.; Zinsstag, J.; Pandey, V. S.; Fofana, F. and Depo, A. N. (1999). Epidemiology of Parasites of sheep in the southern forest zone of Côte d'Ivoire. Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux. 52: 39-46.
- Kooyman, F. N. J.; Van Kooten, P. J. S.; Huntley, J. F.; Mackellar, A.; Cornelissen, A. W. and Schallig, H. D. (1997). Production of a monoclonal antibody specific for ovine immunoglobulin E and its application to monitor serum IgE responses to *Haemonchus contortus* infection. Parasitol. 114: 395-406.
- Korepanova, A.; Gao, F.; Hua, Y.; Qin, H.; Nakamoto, R. K. and Cross, T. A. (2005). Cloning and expression of multiple integral membrane proteins from *Mycobacterium tuberculosis* in *Escherichia coli*. Protein Sci. 14: 148–158.
- Lacroux, C.; Nguyen, T. H. C.; Andreoletti, O.; Prevot, F.; Grisez, C.; Bergeaud, J. P.; Gruner, L.; Brunel, J. C.; Francoise, D.; Dorchies, P. and Jacquet, P. (2006). *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) infection in lambs elicits an unequivocal Th-2 immune response. Vet. Res. 37: 607–622.
- Launay-Vacher, V.; Izzedine, N.; Karie, S.; Hulot, S.; Baumelou, A.; Deray, G. (2006). Renal tubular drug transporters. Nephron Physiol. 22: 97-106.
- LeBlanc-Straceski, J.; Sobrado, P.; Betz, S.; Zerfas, J. and Morgan, K. (2006). The lift pool method for isolation of cDNA clones from lambda phage libraries. Electronic J. Biotechnol. 9: 449-455.
- Leenaars, P.; Koedam, M.; Wester, P.; Baumans, V.; Claassen, E. and Hendriksen, C. F. (1998). Assessment of side effects induced by injection of different adjuvant/antigen combinations in rabbits and mice. Lab. Anim. 32: 387-406.
- LeJambre, L. F.; Windon, R. G. and Smith, W. D. (2008). Vaccination against *Haemonchus contortus*: Performance of native parasite gut membrane glycoproteins in Merino lambs grazing contaminated pasture. Vet. Parasitol. 153: 302-312.
- Levy, E. D.; Landry, C. R. and Michnick, S. W. (2009). How Perfect Can Protein Interactomes be? Sci. Signal. 2: pe11.
- Li, Y.; Miller, J. E. and Franke, D. E. (2001). Epidemiological observation and heterosis analysis of gastrointestinal nematode parasitism in Suffolk, Gulf Coast Native and Crossbred lambs. Vet. Parasitol. 98: 273-283.
- Lichtenfels, J. R.; Pilitt, P. A.; Gibbons, L. M. and Boomker, J. D. F. (2001). *Haemonchus horaki* n. sp. (Nematoda: Trichostrongyloidea) from the grey rhebuck *Pelea capreolus* in South Africa. J. Parasitol. 87: 1095–1103.
- Lichtenfels, J. R.; Pilitt, P. A.; Gibbons, L. M. and Hoberg, E. P. (2002). Redescriptions of *Haemonchus mitchelli* and *Haemonchus okapiae* (Nematoda: Trichostrongyloidea) and description of a unique synlophe for the Haemonchinae. J. Parasitol. 88: 947–960.
- Liddell, S. and Knox, D. P. (1998). Extracellular and cytoplasmic Cu/Zn superoxide dismutases from *Haemonchus contortus*. Parasitol. 116: 383–397.

- Lightowlers, M. W.; Colebrook, A. L.; Gauci, C. G.; Gauci, S. M.; Kyngdon, C. T.; Monkhouse, J. L.; Vallejo Rodriguez, C.; Read, A. J.; Rolfe, R. A. and Sato, C. (2003). Vaccination against cestode parasites: anti-helminth vaccines that work and why. Vet. Parasitol. 115: 83-123.
- Lightowlers, M. W.; Flisser, A.; Gauci, C. G.; Heath, D. D.; Jensen, O. and Rolfe, R. (2000). Vaccination against cysticercosis and hydatid disease. Parasitol. Today. 16: 191–196.
- Lindblad, E. B. (1995). Aluminium adjuvants, p. 21–35. In D. E. S. Stewart-Tull (ed.), The theory and practical application of adjuvants. John Wiley and Sons Ltd, New York, N.Y.
- Lindqvist, A.; Ljungstrom, B. L.; Nilsson, O. and Waller, P. J. (2001): The dynamics, prevalence and impact of nematode parasite infections in organically raised sheep in Sweden. Acta. Vet. Scand. 42: 377–389.
- Lo, D. Y.; Hung, C. N.; Lee, W. C.; Liao, J. W.; Blacklaws, B. A.; Chen, T. H.; Chien, M. S. and Hsuan, S. L. (2009). Effect of immunostimulation by detoxified *E. coli* lipopolysaccharide combined with inactivated *Propionibacterium granulosum* cells on porcine immunity. J. Vet. Med. Sci. 71: 897-903.
- London, C. A.; Abbas, A. K. and Kelso, A. (1998). Helper T cell subsets: heterogeneity, functions and development. Vet. Immunol. Immunopathol. 63: 37-44.
- Longbottom, D.; Redmond, D. L.; Russell, M.; Liddell, S.; Smith, W. D. and Knox, D. P. (1997). Molecular cloning and characterisation of a putative aspartate proteinase associated with a gut membrane protein complex from adult *Haemonchus contortus*. Mol. Biochem. Parasitol. 88: 63-72.
- Macaldowie, C.; Jackson, F.; Huntley, J.; Mackellar, A. and Jackson, E. (2003). A comparison of larval development and mucosal mast cell responses in worm-naïve goat yearlings, kids and lambs undergoing primary and secondary challenge with *Teladorsagia circumcincta*. Vet. Parasitol. 114: 1-13.
- MAFF (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food) (1971). Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques. HMSO, London.
- Maizels, R. M. and Lawrence, R. A. (1991). Immunological tolerance: The key feature in human Filariasis? Parasitol. Today. 7: 271-276.
- Maizels, R. M. and Yazdanbakhsh, M. (2003). Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. Nat. Rev. Immunol. 3: 733-744.
- Marianayagam, N. J.; Sunde, M. and Matthews, J. M. (2004). The power of two: protein dimerization in biology. Trends Biochem. Sci. 29: 618-625.
- Matthews, J. B.; Davidson, A. J.; Freeman, K. L. and French, N. P. (2001). Immunisation of cattle with recombinant acetylcholinesterase from *Dictyocaulus viviparus* and with adult worm ES products. Int. J. Parasitol. 31: 307-317.
- McClure, S. J.; Davey, R. L.; Emery, D. L.; Colditz, I. G. and Lloyd, J. B. (1996). In vivo depletion of T-cells and cytokines during primary exposure of sheep to parasite. Vet. Immunol. Immunopathol. 54: 83-90.

- McClure, S. J.; Emery, D. L. and Steel, J. W. (2000). Host resistance to gastrointestinal parasite of sheep. In: *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction*. CABI Publishing, Oxon, UK pp. 425-436.
- McClure, S. J.; Emery, D. L.; Bendixsen, T. and Davey, R. J. (1998). Attempts to generate immunity against *Trichostrongylus colubriformis* and *Haemonchus contortus* in young lambs by vaccination with viable parasites. Int. J. Parasitol. 28: 739-46.
- McClure, S. J.; Emery, D. L.; Wagland, B. M. and Jones, W. O. (1992). A serial study of rejection of *Trichostrongylus colubriformis* by immune sheep. Int. J. Parasitol. 22: 227-234.
- McCreery, T. (1997). Digoxigenin Labeling. Mol. Biotechnol. 7: 121-124.
- McGonigle, S. and Dalton, J. P. (1995). Isolation of *Fasciola hepatica* haemoglobin. Parasitol. 111: 209-215.
- Meeusen, E. N. T. (1999). Immunology of helminth infections, with special reference to immunopathology. Vet. Parasitol. 84: 259- 273.
- Meeusen, E. N. T.; Balic, A. and Bowles, V. (2005). Cells, cytokines and other molecules associated with rejection of gastrointestinal nematode parasites. Vet. Immunol. Immunopathol. 108: 121-125.
- Miller, H. R. P. (1987). Gastrointestinal mucous, a medium for survival and for elimination of parasitic nematodes and protozoa. Parasitol. 94: S77- S100.
- Miller, H. R. P. (1996). Prospects for the immunological control of ruminant gastrointestinal nematodes: natural immunity, can it be harnessed? Int. J. Parasitol. 26: 801-811.
- Miller, J. E. and Horohov, D. W. (2006). Immunological aspects of nematode parasite control in sheep. J. Anim. Sci. 84: E124-E132.
- Miller, J. E.; Bahirathan, M.; Lemarie, S. L.; Hembry, F. G.; Kearney, M. T. and Barras, S. R. (1998). Epidemiology of gastrointestinal nematode parasitism in Suffolk and Gulf Coast Native sheep with special emphasis on relative susceptibility to *Haemonchus contortus* infection. Vet. Parasitol. 74: 55-74.
- Mulcahy, G.; O'Neill, S.; Donnelly, S. and Dalton, J. P. (2004). Helminths at mucosal barriers- interactions with immune system. Adv. Drug Deliv. Rev. 56: 853-868.
- Munn, E. A. (1997). Rational design of nematode vaccines: hidden antigens. Int. J. Parasitol. 27: 359-366.
- Munn, E. A.; Smith, T. S.; Smith, H.; James, F. M.; Smith, F. C. and Andrews, S. J. (1997). Vaccination against *Haemonchus contortus* with denaturated forms of protective antigen H11. Parasite Immunol. 19: 243-248.
- Mussalem, J. S.; Vasconcelos, J. R. C.; Squaiella, C. C., Ananias, R. Z.; Braga, E. G.; Rodrigues, M. M. and Longo-Maugéri, I. M. (2006). Adjuvant effect of the *Propionibacterium acnes* and its purified soluble polysaccharide on the immunization with plasmidial DNA containing a *Trypanosoma cruzi* gene. Microbiol. Immunol. 50: 253-263.

- Nayebzadeh, H.; Seyfiabad-Shapouri, M. R.; Hoghooghi-Rad, N. and Masouri, B. (2008). Immunization of Arabian sheep with whole gut homogenate of *Haemonchus contortus*. Iranian J. of Vet. Res. 9: 360-364.
- Newlands, G. F.; Skuce, P. J.; Knox, D. P.; Smith, S. K. and Smith, W. D. (1999). Cloning and characterization of a beta-galactoside-binding protein (galectin) from the gut of the gastrointestinal nematode parasite *Haemonchus contortus*. Parasitol. 119: 483-490.
- Newton, S. (1995). Progress on Vaccination of *Haemonchus contortus*. Int. J. of Parasitol. 25: 1281-1289.
- Newton, S. E. and Meeusen, E. N. T. (2003). Progress and new technologies for developing vaccines against gastrointestinal nematode parasites of sheep. Parasite Immunol. 25: 283-296.
- Newton, S. E. and Munn, E. A. (1999). The development of vaccines against gastrointestinal nematode parasites, particularly *Haemonchus contortus*. Parasitol. Today. 15: 116-122.
- O'Connor, L. J.; Kahn, L. P. and Walkden-Brown, S. W. (2007). The effects of amount, timing and distribution of simulated rainfall on the development of *Haemonchus contortus* to the infective larval stage. Vet. Parasitol. 146: 90-101
- O'Connor, L. J.; Walkden-Brown, S. W. and Kahn, L. P. (2006). Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. Vet. Parasitol. 142: 1-15.
- Onyiah, L. C. and Arslan, O. (2005). Stimulating the development period of a parasite of sheep on pasture under varying temperature conditions. J. Thermal Biol. 30: 203-211.
- Pappaterra Mendoza, G. J.; Mateu de Antonio, E.; Novell-Badal, M. E.; Martín-Castillo, M.; Casal Fábrega, J. and Marca-Puig, J. (2000). In vitro and in vivo effects of an immunomodulator composed of *Escherichia coli* lipopolysaccharide and *Propionibacterium granulosum*-inactivated cells in pigs. J. Vet. Med. B 47: 619-627.
- Patterson, D. M.; Jackson, F.; Huntley, J. F.; Stevenson, L. M.; Jones, D. G.; Jackson, E. and Russel, A. J. (1996). Studies on caprine responsiveness to nematodiasis: segregation of male goats into responders and non-responders. Int. J. Parasitol. 26: 187-194.
- Peacock, R. and Poynter, D. (1980). Field experience with a bovine lungworm vaccine. Symp. Brit. Soc. Parasitol. 18: 141-148.
- Pernthaner, A.; Cole, S.; Morrison, L. and Hein, W. R. (2005). Increased expression of interleukin-5 (IL-5), IL-13, and tumor necrosis factor alpha genes in intestinal lymph cells of sheep selected for enhanced resistance to nematodes during infection with *Trichostrongylus colubriformis*. Infect. Immun. 73: 2175-2183.
- Pernthaner, A.; Stankiewicz, M.; Bisset, S. A.; Jonas, W. E.; Cabaj, W. and Pulford, H. D. (1995). The immune responsiveness of Romney sheep selected for resistance or susceptibility to gastrointestinal nematodes: lymphocyte blastogenic activity, eosinophilia and total white blood cell counts. Int. J. for Parasitol. 25: 523-529.

- Perry, B. D.; Randolph, T. F.; McDermott, J. J.; Sones, K. R. and Thornton, P. K. (2002). Investing in animal health research to alleviate poverty. International Livestock Research Institute (ILRI), Nairobi, Kenya. 148.
- Pfeffer, A.; Douch, P. G. C.; Shaw, R. J.; Gatehouse, T. K.; Rabel, B.; Green, R. S.; Shirer, C. L.; Jonas, W. E. and Bisset, S. (1996). Sequential cellular and humoral responses in the abomasal mucosa and blood of Romney sheep dosed with *Trichostrongylus axei*. Int. J. Parasitol. 26: 765–773.
- Ploeger, H. W. (2002). *Dictyocaulus viviparus*: re-emerging or never been away? Trends Parasitol. 18: 329-332.
- Poynter, D. (1963). Parasitic bronchitis. Adv. Parasitol. 1: 179-212.
- Quiroz, R. H. (1999). Estrongilosis gastroentéricas. Parasitología y enfermedades parasitarias de los animals domésticos. 2º Ed. Limusa, S.A.; México. 430-458.
- Radhakrishnan, C. V.; Bradley, R. E. and Loggins, P. E. (1972). Host response of worm Free - Florida native and Rambouillet lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus*. Am. J. Vet. Res. 33: 817-823.
- Rahman, W. A. and Collins, G. H. (1990). The establishment and development of *Haemonchus contortus* in goats. Vet. Parasitol. 35: 189-193.
- Rainbird, M. A.; Macmillan, D. and Meeusen, E. N. T. (1998). Eosinophil-mediated killing of *Haemonchus contortus* larvae: effect of eosinophil activation and role of antibody, complement and interleukin-5. Parasite Immunol. 20: 93–103.
- Raleigh, J. M.; Brandon, M. and Meeusen, E. N. T. (1996). Stage-specific expression of surface molecules by the larval stages of *Haemonchus contortus*. Parasite Immunol. 18: 125-132.
- Redmond, D. L. and Knox, D. P. (2004). Protection studies in sheep using affinity-purified and recombinant cysteine proteinases of adult *Haemonchus contortus*. Vaccine. 22: 4252-61.
- Redmond, D. L.; Knox, D. P.; Newlands, G.; Smith, W. D. (1997). Molecular cloning and characterisation of a developmentally regulated putative metallopeptidase present in a host protective extract of *Haemonchus contortus*. Mol. Biochem. Parasitol. 85: 77-87.
- Rickard, M. D.; Harrison, G. B.; Heath, D. D. And Lightowlers, M. W. (1995). *Taenia ovis* recombinant vaccine--'quo vadit'. Parasitol. 110: S5-S9.
- Roberts, L. S.; Schmidt, G. D. and Janovy, J. Jr. (2004). Nematodes: Strongylida, bursate rhabditioans. In: (Ed.) Gerald D. Schmidt and Larry S. Roberts Foundations of Parasitology. McGraw-Hill, 426.
- Rossanigo, C. E. and Gruner, L. (1995). Moisture and temperature requirements in faeces for the development of free-living stages of gastrointestinal nematodes of sheep, cattle and deer. J. Helminthol. 69: 357-362.
- Rothenberg, M. E. and Hogan, S. P. (2006). The eosinophil. Annu. Rev. Immunol. 24: 147–174.

- Rothwell, T. L. W. (1989). Immune expulsion of parasitic nematode from the alimentary tract. Int. J. Parasitol. 19: 139-168.
- Rowe, A.; McMaster, K.; Emery, D. and Sangster, N. (2008). *Haemonchus contortus* infection in sheep: parasite fecundity correlates with worm size and host lymphocyte counts. Vet. Parasitol. 153: 285-293.
- Rowe, J. B.; Nolan, J. V.; de Chaneet, G. and Teleni E. (1988). The effect of haemonchosis and blood loss into the abomasum on digestion of sheep. Br. J. Nutr. 59: 125-139.
- Rufener, L.; Mäser, P.; Roditi, I. and Kaminsky, R. (2009). *Haemonchus contortus* acetylcholine receptors of the DEG-3 subfamily and their role in sensitivity to monepantel. PLoS Pathog. 5: e1000380:1-11.
- Salman, S. K. and Duncan, J. L. (1984). The abomasal histology of worm-free sheep given primary and challenge infections of *Haemonchus contortus*. Vet. Parasitol. 16: 43-54.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning, a laboratory Manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (USA), pp.:1.53; 2.52;2.60-2.80; 3.35-3.40; 5.61-5.72; 5.83; 6.2-6.62;7.30;8.46-8.48; 8.58-8.79; 14.14-14.18; 17.37-17-41.
- Sasisekhar, B.; Suba, N.; Sindhuja, S.; Sofi, G. M.; Narayanan, R. B. (2005). *Setaria digitata*: identification and characterization of a hypodermally expressed SXP/RAL2 protein. Exp. Parasitol. 111: 121-125.
- Schallig, H. D. (2000). Immunological responses of sheep to *Haemonchus contortus*. Parasitol. 120: S63-S72.
- Schallig, H. D. and van Leeuwen, M. A. (1997). Protective immunity to the blood-feeding nematode *Haemonchus contortus* induced by vaccination with parasite low molecular weight antigens. Parasitol. 114: 293-299.
- Schallig, H. D.; van Leeuwen, M. A. and Cornelisen, A. W. (1997a). Protective immunity induced by vaccination with two *Haemonchus contortus* excretory/ secretory proteins in sheep. Parasite Immunol. 19: 447-453.
- Schallig, H. D.; van Leeuwen, M. A. and Hendriks, W. M. (1994). Immune responses of Texel sheep to excretory / secretory products of adult *Haemonchus contortus*. Parasitol. 108: 351-357.
- Schallig, H. D.; van Leeuwen, M. A. and Hendriks, W. M. (1995). Isotype-specific serum antibody responses of sheep to *Haemonchus contortus* antigens. Vet. Parasitol. 56: 149-62.
- Schallig, H. D.; van Leeuwen, M. A.; Verstrepen, B. E. and Cornelissen, A. W. (1997 b). Molecular characterization and expression of two putative protective excretory secretory proteins of *Haemonchus contortus*. Mol. Biochem. Parasitol. 88: 203-213.
- Scott, I.; Dick, A.; Irvine, J.; Stear, M. J. and McKellar, Q. A. (1999). The distribution of pepsinogen within the abomasa of cattle and sheep infected with *Ostertagia* spp. and sheep infected with *Haemonchus contortus*. Vet. Parasitol. 31:145-59.

- Scott, I.; Stear, M. J.; Irvine, J.; Dick, A.; Wallace, D. S. and McKellar, Q. A. (1998). Changes in the zymogenic cell populations of the abomasal of sheep infected with *Haemonchus contortus*. Parasitol. 116: 569-577.
- Sharp, P. J.; Smith, D. R. J.; Bach, W.; Wagland, B. M. and Cobon, G. S. (1991). Purified glutathione S-transferases from parasites as candidate protective antigens. Int. J. Parasitol. 21: 839-846.
- Sher, A.; Coffman, R. L.; Hieny, S. and Cheever, A. W. (1990). Ablation of eosinophil and IgE responses with anti-IL-5 or anti-IL-4 antibodies fails to affect immunity against *Schistosoma mansoni* in the mouse. J. Immunol. 145: 3911-3916.
- Simcock, D. C.; Joblin, K. N.; Scott, I.; Burgess, D. M.; Rogers, C. W.; Pomroy, W. E. and Simpson, H. V. (1999). Hypergastrinaemia, abomasal bacterial population densities and pH in sheep infected with *Ostertagia circumcincta*. Int. J. Parasitol. 29: 1053-1063.
- Simons, P. C. and Vander Jagt, D. L. (1977). Purification of glutathione S-transferases from human liver by glutathione-affinity chromatography. Anal. Biochem. 82: 334-341.
- Simpson, H. V. (2000). Pathophysiology of abomasal parasitism: is the host or parasite responsible? Vet. J. 160: 177-191.
- Slotved, H. C.; Barnes, E. H.; Bjørn, H.; Christensen, C. M.; Eriksen, L.; Roepstorff, A. and Nansen, P. (1996). Recovery of *Oesophagostomum dentatum* from pigs by isolation of parasites migrating from large intestinal contents embedded in agar-gel. Vet. Parasitol. 63: 237-245.
- Smith, S. K.; Pettit, D.; Newlands, G. F.; Redmond, D. L.; Skuce, P. J.; Knox, D. P. and Smith, W. D. (1999). Further immunization and biochemical studies with a protective antigen complex from the microvillar membrane of the intestine of *Haemonchus contortus*. Parasite Immunol. 21: 187-199.
- Smith, T. S.; Graham, M.; Munn, E. A.; Newton, S. E.; Knox, D. P.; Coadwell, W. J.; McMichael-Phillips, D.; Smith, H.; Smith, W. D. and Oliver, J. J. (1997). Cloning and characterization of a microsomal aminopeptidase from the intestine of the nematode *Haemonchus contortus*. Biochim. Biophys. Acta. 1338: 295-308.
- Smith, T. S.; Munn, E. A.; Graham, M.; Tavernor, A. S. and Greenwood, C. A. (1993). Purification and evaluation of the integral membrane protein H11 as a protective antigen against *Haemonchus contortus*. Int. J. Parasitol. 23: 271-280.
- Smith, W. D. (1988). Mechanisms of immunity to gastrointestinal nematodes of sheep. In increasing small ruminant productivity in Semi-arid areas (ed. Thomson, E. F. and Thomson, F. S.). ICARDA: The Netherlands. 275-286.
- Smith, W. D. (2007). Attempts to detect synergy between vaccination and anthelmintic against a drug resistant isolate of *Haemonchus contortus*. Vet. Parasitol. 148: 356-359.
- Smith, W. D. and Angus, K. W. (1980). *Haemonchus contortus*: Attempts to immunise lambs with irradiated larvae. Res. Vet. Sci. 29: 45-50.
- Smith, W. D. and Zarlenga, D. S. (2006). Developments and hurdles in generating vaccines for controlling helminth parasites of grazing ruminants. Vet. Parasitol. 139: 347-359.

- Smith, W. D.; Jackson, F.; Jackson, E. and Williams, J. (1985). Age immunity to *Ostertagia circumcincta*: comparison of the local immune response of 4 1/2 and 10 month-old lambs. J. Comp. Pathol. **95**: 235-245.
- Smith, W. D.; Smith, S. K. and Murray, J. M. (1994). Protection studies with integral membrane fractions of *Haemonchus contortus*. Parasite Immunol. **16**: 231-241.
- Smith, W. D.; van Wyk, J. A. and van Strijp, M. F. (2001). Preliminary observations on the potential of gut membrane proteins of *Haemonchus contortus* as candidate vaccine antigens in sheep on naturally infected pasture. Vet. Parasitol. **98**:285–297.
- Soulsby, E. J. L. (1982). Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals. 2nd Ed. Bailliere Tindall, London. pp: 231-235.
- Squaiella, C. C.; Ananias, R. Z.; Mussalem, J. S.; Braga, E. G.; Rodrigues, E. G.; Travassos, L. R.; Lopes, J. D. and Longo-Maugéri, I. M. (2006). In vivo and in vitro effect of killed *Propionibacterium acnes* and its purified soluble polysaccharide on mouse bone marrow stem cells and dendritic cell differentiation. Immunobiol. **211**: 105–116.
- Stankiewicz, M.; Cabaj, W.; Pernthaner, A. and Hadas, E. (1996). Immunisation of sheep by drug-abbreviated infections of *Ostertagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* against field challenge of gastro-intestinal nematodes. Vet. Parasitol. **67**: 121-132.
- Stear, M. J.; Bairden, K.; McKellar, Q. A.; Scott, I.; Strain, S. and Bishop, S. C. (1999). The relationship between the number and size of nematodes in abomasums and concentration of Pepsinogen in ovine plasma. Res. Vet. Sci. **67**: 89-92.
- Stear, M. J.; Bishop, S. C.; Doligalska, M.; Duncan, J. L.; Holmes, P. H.; Irvine, J.; McCririe, L.; McKellar, Q. A.; Sinski, E. and Murray, M. (1995). Regulation of egg production, worm burden, worm length and worm fecundity by host responses in sheep infected with *Ostertagia circumcincta*. Parasite Immunol. **17**: 643–652.
- Stear, M. J.; Henderson, N. G.; Keer, A.; McKellar, Q. A.; Mitchell, S.; Seeley, C. and Bishop, S. C. (2002). Eosinophilia as a marker of resistance to *Teladorsagia circumcincta* in Scottish Blackface lambs. Parasitol. **124**: 553-560.
- Stevenson, L. M.; Huntley, J. F.; Smith, W. D.; and Jones, D. G. (1994). Local eosinophil- and mast cell-related responses in abomasal nematode infections of lambs. Immunol. Med. Microbiol. **8**: 167-73.
- Stills, H. F. Jr. (2005). Adjuvants and antibody production: Dispelling the myths associated with freund's complete and other adjuvants. ILAR J. **46**: 280-293.
- Strain, S. A. J. and Stear, M. J. (2001). The influence of protein supplementation on the immune response to *Haemonchus contortus*. Parasite Immunol. **23**: 527-531.
- Subramanian, A. (2002). Immunoaffinity Chromatography. Mol. Biotechnol. **20**: 41-47.
- Szewczyk, B. and Summers, D. F. (1992). Efficient elution of purified proteins from polyvinylidene difluoride membranes (Immobilon) after transfer from SDS-PAGE and

their use as immunogens. In Methods in Molecular Biology, vol. 10: Immunochemical Protocols, ed. M. Manson, The Humana Press, Inc.; Totowa, NJ, USA. pp. 7-12.

Tavernor, A. S.; Smith, T. S.; Langford, C. F.; Graham, M. and Munn, E. A. (1992b). Immune response of Clun Forest sheep to vaccination with membrane glycoproteins from *Haemonchus contortus*. Parasite Immunol. 14: 671–675.

Tavernor, A. S.; Smith, T. S.; Langford, C. F.; Munn, E. A. and Graham, M. (1992a). Vaccination of young Dorset lambs against haemonchosis. Parasite Immunol. 14: 645–655.

Taylor, M.; Hunt, K. R.; Wilson, C. A.; Quick, J. M. (1990). Clinical observations, diagnosis and control of *Haemonchus contortus* infection in periparturient ewes. Vet. Rec. 126: 555-556.

Tembely, S.; Lahlou-kassi, A.; Rege, J. E. O.; Sovani, S.; Diedhiou, M. L. and Baker R. L. (1997). The epidemiology of nematode infections in sheep in a cool tropical environment. Vet. Parasitol. 70: 129-141.

Terefe, G.; Lacroux, C.; Andreoletti, O.; Grisez, C.; Prevot, F.; Bergeaud, J. P.; Penicaud, J.; Rouillon, P.; Gruner, L.; Brunel, J. C.; Francois, D.; Bouix, J.; Dorchies, P. and Jacquet, P. (2007). Immune response to *Haemonchus contortus* infection in susceptible (INRA 401) and resistant (Barbados Black Belly) breeds of lambs. Parasite Immunol. 29: 415–424.

Terefe, G.; Yacob, H. T.; Grisez, C.; Prevot, F.; Dumas, E.; Bergeaud, J. P.; Dorchies, P.; Hoste, H. and Jacquet, P. (2005). *Haemonchus contortus* egg excretion and female length reduction in sheep previously infected with *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) larvae. Vet. Parasitol. 31: 271-83.

Titchen, D. A. (1982). The biology and control of endoparasites. London Academic press, pp. 257-277.

Tizard, I. (1992). An Introduction to Veterinary Immunology, 4th Ed. W. B. Saunders, Philadelphia.

Torgerson, P. R. and Lloyd, S. (1992). Lymphocyte reactivity to antigens of *Haemonchus contortus* in antigen-inoculated and *H. contortus*-naive lambs. Am. J. Vet. Res. 53:1699-1704.

Torgerson, P. R. and Lloyd, S. (1993a). The B cell dependence of *Haemonchus contortus* antigen induced lymphocyte proliferation. Int. J. Parasitol. 23: 925-930.

Torgerson, P. R. and Lloyd, S. (1993b). The same fractions of *Haemonchus contortus* soluble antigen induce lymphocyte responses in naive lambs and immune sheep. Res. Vet. Sci. 54: 244-246.

Tremain, S. A. and Emery, D. L. (1994). Myoelectric activity of the small intestine during parasitic rejection. Proc. 30th Annu. Sci. Meet. Aust. Soc. Parasitol.; Nelson Bay, New South Wales, Australia. pp. 43.

Turnbull, I. F.; Bowles, V. M.; Wiltshire, C. J.; Brandon, M. R. and Meeusen, E. N. T. (1992). Systemic immunization of sheep with surface antigens from *Haemonchus contortus* larvae. Int. J. Parasitol. 22: 537-40.

- Urban, J. F.; Kotona, I. M.; Paul, W. E. and Finkelman, F. D. (1991). Interleukin 4 is important in protective immunity to gastrointestinal nematode infection in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88: 5513–5517.
- Urban, J. F.; Madden, K. B. and Svetic, A. (1992). The importance of Th2 cytokines in protective immunity to nematodes. Immunol. Rev. 127: 205-220.
- Urquhart, G. M.; Armour, J.; Duncan, J. L.; Dunn, A. M. and Jenings, F. W. (2001). Parasitología Veterinaria. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España.
- Valcárcel, F. and García Cromero, C. (1999). Prevalence and seasonal pattern of caprine trichostrongyloides in a dry area of central Spain. J. Vet. Med. B 46: 673-681.
- van-Houtert, M. F. and Sykes, A. R. (1996). Implications of nutrition for the ability of ruminants to withstand gastrointestinal nematodes infections. Int. J. Parasitol. 26: 1151-1167.
- van-Rossum, A. J.; Jefferies, J. R.; Rijsewijk, F. A.; LaCourse, E. J.; Teesdale-Spittle, P.; Barrett, J.; Tait, A. and Brophy, P. M. (2004). Binding of hematin by a new class of glutathione transferase from the blood-feeding parasitic nematode *Haemonchus contortus*. Infect. Immun. 72: 2780-90.
- Vercauteren, I.; Geldhof, P.; Peelaers, I.; Claerebout, E.; Berx, G. and Vercruysse, J. (2003). Identification of excretory-secretory products of larval and adult *Ostertagia ostertagi* by immunoscreening of cDNA libraries. Mol. Biochem. Parasitol. 126: 201-208.
- Vervelde, L.; Bakker, N.; Kooyman, F. N.; Cornelissen, A. W.; Bank, C. M.; Nyame, A. K.; Cummings, R. D. and van Die, I. (2003). Vaccination-induced protection of lambs against the parasitic nematode *Haemonchus contortus* correlates with high IgG antibody responses to the LDNF glycan antigen. Glycobiol. 13: 795–804.
- Vervelde, L.; Kooyman, F. N.; van Leeuwen, M. A.; Schallig, H. D.; MacKellar, A.; Huntley, J. F. and Cornelissen, A. W. (2001). Age-related protective immunity after vaccination with *Haemonchus contortus* excretory/secretory proteins. Parasite Immunol. 23: 419-423.
- Vervelde, L.; van Leeuwen, M. A.; Kruidenier, M.; Kooyman, F. N.; Huntley, J. F.; Van Die, I. and Cornelissen, A. W. (2002). Protection studies with recombinant excretory /secretory protein of *Haemonchus contortus*. Parasite Immunol. 24: 189–201.
- Vlasoff, A.; Leathwick, D. M. and Heath, A. C. (2001). The epidemiology of nematode infections of sheep. NZ. Vet. J. 49: 213–221.
- Wakelin, D. (1995). Immunity and immunogenetics, new approaches to controlling worm infections in sheep. Br. Vet. J. 151: 111-112.
- Wallace, D. S.; Bairden, K.; Duncan, J. L.; Fishwick, G.; Gill, M.; Holmes, P. H.; McKellar, Q. A.; Murray, M.; Parkins, J. J. and Stear, M. J. (1995). Influence of supplementation with dietary soyabean meal on resistance to haemonchosis in Hampshire down lambs. Res. Vet. Sci. 58: 232-237.
- Waller, P. J. (1997). Nematode parasite control of livestock in tropics/subtropics: the need of novel approaches. Int. J. Parasitol. 27: 1193-1201.

- Waller, P. J. (2006). Epidemiologically based control of *Haemonchus contortus* in small ruminants. IN: ISVEE 11: Proceedings of the 11th Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics, Cairns, Australia, Theme 3 - Animal health delivery & response: Disease control session. Cairns (Australia): International Symposia for Veterinary Epidemiology and Economics (ISVEE). pp. 57.
- Waller, P. J. and Chandrawathani, P. (2005). *Haemonchus contortus*: parasite problem No. 1 from tropics-polar circle. Problems and prospects for control based on epidemiology. Trop. Biomed. 22: 131-137.
- Waller, P. J.; Echevarria, F.; Eddi, C.; Maciel, S.; Nari, A. and Hansen, J. W. (1996). The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: general overview. Vet. Parasitol. 62: 181-187.
- Wanyangu, S. W.; Mugambi, J. M.; Bain, R. K.; Duncan, J. L.; Murray, M. and Stear, M. J. (1997). Response to artificial and subsequent natural infection with *Haemonchus contortus* in Red Maasai and Dorper ewes. Vet. Parasitol. 69: 275-282.
- Watson, D. I. and Gill, H. S. (1991). Post natal ontogeny of immunological responsiveness in Merino sheep. Res. Vet. Sci. 51: 88-93.
- Watson, D. I.; Colditz, I. G.; Andrew, M.; Gill, H. S. and Altmann, K. G. (1994). Age-dependent immune response in Merino sheep. Res. Vet. Sci. 57: 152-158.
- Weiss, R. A.; Chanana, A. D. and Joel, D. D. (1986). Postnatal maturation of pulmonary antimicrobial defense mechanisms in conventional and germ-free lambs. Pediatric Res. 20: 496-504.
- Wilfinger, W. W.; Mackey, K. and Chomczynski, P. (1997). PCR-based method for isolation of full-length clones and splice variants from cDNA libraries. Biotechniques. 22: 481-486.
- Willadsen, P.; Cobon, G. S.; Hungerford, J. and Smith, D. (1995). The role of vaccination in current and future strategies for tick control. International Seminar of Animal Parasitology: Resistance and Control of Ticks and Flies of Veterinary Importance. Acapulco, Mexico, 88-100.
- Willadsen, P.; McKenna, R. V. and Riding, G. A. (1988). Isolation from the cattle tick *Boophilus microplus*, of antigenic material capable of eliciting a protective immunological response in the bovine host. Int. J. Parasitol. 18: 183-189.
- Wilson, L.; Merritte, T.; Rugh, M.; Thompson, C. and Rothenbacher, H. (1996). Effect of *Haemonchus contortus* inoculation on growth rate, feed efficiency and haematology of feeder lambs. Vet. Med. Small Anim. Clin. 64: 59-62.
- Wood, P. R. and Seow, H. F. (1996). T cell cytokines and disease prevention. Vet. Immunol. Immunopathol. 54: 33-44.
- Woolaston, R. R. (1992). Selection of Merino sheep for increased and decreased resistance to *Haemonchus contortus*: periparturient effects on faecal egg counts. Int. J. Parasitol. 22: 947-953.
- Woolaston, R. R.; Manueli, P.; Eady, S. J.; Barger, I. A.; Le Jambre, L. F.; Banks, D. J. D. and Windon, R. G. (1996). The value of circulating eosinophil count as a selection

criterion for resistance of sheep to trichostrongyle parasites. Int. J. Parasitol. 26:123–126.

Wrigley, J.; McArthur, M.; McKenna, P. B. and Mariadass, B. (2006). Resistance to a triple combination of broad-spectrum anthelmintics in naturally-acquired *Ostertagia circumcincta* infections in sheep. NZ Vet. J. 54: 47–49.

Xu, Z.; Wang, F.; Peng, L.; Fang, X. and Cen, P. (2005). Expression of human beta defensin-2 with multiple joined genes in *Escherichia coli*. Appl. Biochem. Biotechnol. 120: 1-13.

Yanming, S.; Ruofeng, Y.; Muleke, C. I. ; Guangwei, Z.; Lixin, X. and Xiangrui, L. (2007). Vaccination of goats with recombinant galectin antigen induces partial protection against *Haemonchus contortus* infection. Parasite Immunol. 29: 319-326.

Zhao, G.; Yan, R.; Muleke, C. I.; Sun, Y.; Xu, L. and Li, X. (2012). Vaccination of goats with DNA vaccines encoding H11 and IL-2 induces partial protection against *Haemonchus contortus* infection. Vet. J. 191: 94-100.

Zimmermann, B. and Herberg, F. W. (1998). Interactions of 6xHis-tagged protein kinase A catalytic subunit examined using Ni-NTA Magnetic Agarose Beads. QIAGEN News. 1998 No. 4, 9.

I. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

In English

aa: Amino acid

AADs: Amino-Acetonitrile Derivatives

Ab: Antibody

Ag: antigen

Al (OH)₃: Aluminium hydroxide

AP: a microsomal amino-peptidase

APC: A presenting cells

ASC: Antibody secreting cell

ASE: Adult soluble extract

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

BLASTn: Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool

BLASTp: Protein Basic Local Alignment Search Tool

bp: base pair

BSA: Bovine serum albumin

BZs: Benzimidazoles

°C: degrees centigrade

CABP: Glycosylated integral membrane protein

CaCl₂: Calcium chloride

CD: Cluster of differentiation of T cells

cDNA: Complementary deoxyribonucleic acid

CFA: Freund's Complete Adjuvant

cm: Centimetres

CO₂: Carbon dioxide

Con-A: Concanavalin A

Conc: Concentrated

C-terminal: Carboxy-terminal

dATP, dTTP, dCTP, dGTP, dUTP: deoxy Adenine, Thymine, Cytosine, Guanine, and uracil triPhosphate

DCs: Dendritic cells

DDBJ: DNA Data Bank of Japan

DDT: Dichlorodiphenyltrichloroethane

DEPC: Diethyl pyrocarbonate

dH₂O: Distilled water
 DMSO: Dimethyl sulfoxide
 DNA: desoxyribonucleic acid
 DNase: Deoxyribonuclease
 dNTP: Deoxyribonucleotide triphosphate
 DTT: dithiothreitol
 DUF: Domain of unknown function
E. coli: *Escherichia coli*
 e.g.: exempli gratia
 EB: Elution buffer
 EcoR1 adapters: *Escherichia coli* (RY13) 1 adpaters
 EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid
 EG95 vaccine: *Echinococcus granulosus* 95 kDa recombinant vaccine
 ELISA: Enzyme-linked immuno-sorbent assay
 EMBL: The European Molecular Biology Laboratory
 EPG: Eggs per Gram
 ES: excretory/secretory
 et al. : Et alii
 EtBr: Ethidium bromide
 ETC: Etcetera
F. hepatica: *Fasciola hepatica*
 F: Fraction
 FAO: Food and agriculture organization
 FEC: Faecal Egg Count
 FT: Flow through
 G: Gram
 GINs: Gastrointestinal nematodos
 GLM: Generalised linear model
 Gly: Glycine
 GSH: reduced glutathione
 GST: glutathione transferase
 GTC: guanidine thiocyanate
H. contortus: *Haemonchus contortus*
 h: hour

H11: Intestinal membrane glycoprotein of *H. contortus* (110 kDa)
H₂O: Water
HAGs: Hidden antigens
Hb: Hemoglobin
Hc GA1 poly protein: *Haemonchus contortus* gut antigen 1 polypeptide
Hc PEP: *Haemonchus contortus* pepsin
HCl: Hydrochloric acid
Hco-gal-2: *Haemonchus contortus* galectin 2
Hc-SL3: Surface of L3 larvae antigen of *Haemonchus contortus*
H-gal-GP: Galactase containing glycoprotein complex
Hmcp: cathepsin B-like cysteine proteinases purified from *H. contortus*
Hz: hertz
i.e. : id est
I/M: Intra muscular
ICC: Immunoglobulin containing cells
ID: diameter
IFA: Freund's Incomplete Adjuvant
IFN- γ : Interferon-gamma
IgA: Immunoglobulin A
IgE: Immunoglobulin E
IgG, IgG1, IgG2: Immunoglobulin G, 1 & 2
IgM: Immunoglobulin M
IL: Interleukin
IPTG: Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside
IU: International Unit
kb : Kilo bases
KCl: Potassium Chloride
KDa: KiloDalton
kg: Kilogramo
L: Litres
L3 of *H. contortus*: Larvae 3 of *Haemonchus contortus*
L4: Larvae 4
L5: Larvae 5
LB media: Luria-Bertani (LB)

LEV: Imidothiazoles
 LSE: Larvae soluble extract
 M: Molar
 mA: milliAmpere
 MAFF: Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries
 MEP: Metalloendopeptidases
 mg/dl: milligram por decilitro
 mg: milligram
 MgCl₂: Magnesium chloride
 MgSO₄: Magnesium sulphate
 MHC: Major histocompatibility complex
 µg: micro gram
 min: minute
 mL: millilitre
 MLs: Macrocyclic Lactones
 mm: millimetre
 mM: millimolar
 MR: Mannose receptors
 mRNA: Messenger ribonucleic acid
 MW: molecular weight
 MWCO: Molecular weight cut off
 NaCl₂: Sodium chloride
 NAGs: Natural antigens
 NB: Neutralization buffer
 NCBI: National Center for Biotechnology Information
 Nde1: Neisseria denitrificans (NRCC 31009)1
 ng: Nanogram
 NHS-Activated sepharose: N-Hydroxysuccinimide Activated sepharose
 Ni-NTA resin: nickel-nitrilotriacetic acid resin
 N-terminal: Amino-terminal
 OD: Optical density
 p26/23: isolated protein from the fraction 23-26 kDa of ASE of *H. contortus*
 PBS: Phosphate buffered saline
 PCR: polymerase chain reaction

PCV:	Packed Cell Volume, i.e. Haematocrit
%:	Percentage
Pfu DNA polymerase:	Hyperthermophilic archaeon <i>Pyrococcus furiosus</i> DNA polymerase
PFU:	Plaque forming unit
pH:	Hydrogen ion concentration
pI:	isoelectric point
PI:	post infection
Pmol:	picomole
PMPs:	Paramagnetic Particles
Poly (A) RNA:	Poly adenine tail added to the 3' end of the pre-mRNA
QTLs:	Quantitative trait loci
rATP:	Adenosine TriPhosphate
Recombinant Bm86 vaccine:	Recombinant <i>Boophilus microplus</i> 86 -based tick vaccines
rHc p26/23:	recombinant form of p26/23
RNA:	ribonucleic acid
rpm:	Revolutions per minute
rRNA:	ribosomal ribonucleic acid
RT:	Room temperature
S/C:	subcutaneous
SD:	Standard deviation
SDS PAGE:	Sodium-dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SDS:	Sodium dodecyl sulphate
SE:	Standard error
Sec:	Seconds
Spp:	Species
SPSS:	Predictive analytics software
SSC buffer:	Saline-sodium citrate buffer
STE buffer:	Sodium –Chloride- Tris-EDTA buffer
<i>T. colubriformis</i> :	<i>Trichostrongylus colubriformis</i>
TAE:	Tris-acetate ethylenediaminetetraacetic acid
Taq:	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBS:	Tris buffered saline
TE buffer:	Tris-EDTA buffer
<i>Tel. circumcincta</i> :	<i>Teladorsagia circumcincta</i>

TEMD: Tetramethylethylenediamine
 TGF-beta: Transforming growth factor beta
 Th1/2: T-helper cell type 1 or 2
 TLRs: Toll-like receptors
 Tm: melting temperature
 TMHMM: Predicting transmembrane helices in protein sequences with a hidden Markov model
 Tris: Tris (hydroxymethyl) amino- methane
 TSBP: thiol-Sepharose binding protein fraction
 Tween: Polyoxyethylenglycolsorbitol-monooleate
 U: units
 UK: United Kingdom
 USA: United States of America
 UV: ultra violet
 V/CM: volume/centimetre
 V/V: volume/volume
 V: Volts
 W: Watts
 WB: Washing buffer
 WBCs: White blood cells
 WGH: Whole gut homogenate
 WHO: World Health Organization
 Wk: week
 Xho1: *Xanthomonas holcicola* (ATCC 13461)1
 xL3: Exsheathed L3
 45W vaccine: *Taenia ovis* Sheep tapeworm 45 kDa recombinant vaccine
 α TNF: Tumor necrosis factor alpha
 β ME: β -mercaptoethanol
 $\gamma\delta$ lymphocyte: gamma delta lymphocyte
 $\gamma\delta$ TCR-T cells : Gamma delta T cell receptor cells

En Español

ACF: adyuvante completo de Freund
 ADN: ácido desoxirribonucleico
 AF: adyuvante de Freund

AIF: adyuvante incompleto de Freund
 Al(OH)₃: hidróxido de aluminio
 ARN: ácido ribonucleico
 ARNasa: ribonucleasa
 BrEt: bromuro de etidio
 ca.: aproximadamente
 cADN: ADN copia
 cm: centímetros
 °C: grados centígrados
 dATP: 2'-desoxiadenina 5'-trifosfato
 dCTP: 2'-desoxicitosina 5'-trifosfato
 dGTP: 2'-desoxiguanina 5'-trifosfato
 dNTPs: desoxinucleósidos 5'-trifosfato
 DO: densidad óptica
 dTTP: 2'-desoxitimina 5'-trifosfato
 ELISA: "enzyme-linked immunosorbent assay"
 ES: antígenos de excreción/ secreción
 ESA: extracto soluble de adultos
 ESL: extracto soluble de larvas
 ES-thiol: ES fraccionados por unión covalente al tiol
 GSH: glutathion reducida
 GST: glutathion-S- transferasa
 h: horas
 HAGS: "hidden antigens" (antígenos ocultos)
 HCl: ácido clorhídrico
 Hc-sL3: antígeno de superficie de L-3 de *H. contortus*
 H-gal-GP: "Haemonchus-galactose-containing glycoprotein complex"
 H₂O: agua
 HPG: huevos por gramo de heces
 Hto: hematocrito
 H11: Glicoproteína integral de membrana de *H. contortus* (110 kDa)
 IgG: inmunoglobulina G
 IPTG: isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
 kg: kilogramo

Min:	Minutos
mL:	mililitros
mm:	milímetros
MOPS:	ácido 3-(N-morpholino) propano-sulfónico
MSD:	Merck, Sharp and Dohme
Met:	metionina
Nº:	numero
NaCl:	cloruro sódico
NAGS:	“natural antigens” (antígenos naturales)
NaH ₂ PO ₄ :	fosfato sódico dihidrógeno
Ni ²⁺ :	níquel
Ni-NTA:	níquel ligado a ácido nitrilotriacético
NZY:	medio para el mantenimiento y propagación del bacteriófago lambda
OEPM:	Oficina Española de Patente y Marcas
O-gal-GP:	“Ostertagia-galactose-containing glycoprotein complex”
oligo(dT):	oligonucleótido de timidina
pb:	pares de bases
PBS:	tampón fosfato salino
PBST:	tampón fosfato salino-0.05% tween-20
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa
PI:	post-infestación
PM:	peso molecular
PV:	post-vacunación
p26/23:	proteína aislada a partir de la fracción de 23-26 kDa de ESA de <i>H. contortus</i>
p46:	proteína de superficie de <i>H. contortus</i> de 46 kDa
p52:	proteína de superficie de <i>H. contortus</i> de 52 kDa
rHcp26/23:	proteína p26/23 recombinante
RP-HPLC:	“Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography”
r.p.m.:	revoluciones por minuto
RT-PCR:	“reverse transcriptase PCR”
SDS:	dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE:	electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras
SM:	tampón utilizado para resuspender el bacteriófago lambda
TA:	temperatura ambiente

TAE: tampón Tris acetato-EDTA

Taq polimerasa: enzima aislado de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*

TBS: tampón Tris salino

TBST: tampón Tris salino-0,05% tween-20

TSBP: “thiol sepharose binding proteins” (proteínas de unión al tiol)

U: unidades

UCM: Universidad Complutense de Madrid

ULL: Universidad de La Laguna

ufc: unidades formadoras de calvas (ufc)

UV: ultravioleta

V: voltios

V/V: Volumen/ Volumen

µg: microgramos

µl: microlitro

II. RESUMEN

Las infestaciones por el nematodo gástrico *Haemonchus contortus* provocan importantes pérdidas económicas en rumiantes, de forma especial en ganado ovino. El control de esta enfermedad se ha basado esencialmente en la utilización de antihelmínticos. Sin embargo, su uso indiscriminado, la falta de un diseño estratégico, escasa rotación de fármacos, junto con el desconocimiento de su epidemiología, han provocado la aparición de fenómenos de resistencia antihelmíntica en muchas partes del mundo la preocupación social por la presencia de residuos con actividad farmacológica en el medio y en los productos cárnicos o lácteos para el consumo; por tanto el empleo de la inmunoprofilaxis es considerado como un sistema alternativo adecuado para el control de esta parasitosis. Se han clonado y expresado numerosos antígenos ocultos (HAGS) de *H. contortus* de potencial interés inmunoprotector; sin embargo, se han realizado pocos esfuerzos para clonar y expresar antígenos naturales (NAGS) que pudieran inducir una respuesta inmunitaria protectora de forma natural durante el transcurso de la infestación.

Algunos antígenos nativos han mostrado ciertos grados de protección contra la hemoncosis pero su eficacia se ha reducido o ha sido nula al utilizar las proteínas recombinantes. La importancia económica de la hemoncosis, las resistencias detectadas en todos los grupos farmacológicos de antihelmínticos y la imposibilidad práctica de las inmunizaciones con proteínas nativas del helminto, ponen de manifiesto la necesidad de utilizar proteínas recombinantes, así como determinar el protocolo de administración más eficaz frente al nematodo. En nuestro estudio nos hemos planteado 1) la purificación y caracterización de la proteína nativa Hc23, que en ensayos previos de vacunación confirió una protección parcial frente a infestaciones con el helminto, 2) la obtención de Hc23 recombinante y 3) la valoración de su capacidad inmunoproláctica frente a la hemoncosis experimental de corderos empleando diferentes adyuvantes.

La purificación de la proteína nativa Hc23 se realizó mediante dos métodos diferentes; de una parte, mediante su elución desde la membrana, y en segundo lugar, por cromatografía de inmovinoafinidad. El primer método de purificación se inició con la sustracción de la Glutathion-S-Transferasa (GST) proteína abundante en helmintos adultos, de masa molecular similar, y sin efecto inmunoprotector, que podía interferir en la obtención de la proteína. El resto del extracto se fraccionó en geles de

poliacrilamida al 12.5% en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE) y fue electrotransferido a Immobilon P. Las piezas de la membrana que contenían Hc23 se cortaron y se eluyó la proteína unida aunque el rendimiento fue bajo y su obtención laboriosa. Para la purificación de Hc23 mediante el segundo método (inmunoadinidad) se emplearon sueros hiperinmunes policlonales anti rHc23 obtenidos en conejo y purificados con proteína A agarosa y permitieron la purificación de la Hc23 nativa mediante cromatografía de inmunoadinidad. Los resultados obtenidos con este método fueron superiores, con un mayor rendimiento y su obtención fue más rápida.

Para la obtención de la proteína recombinante Hc23 hemos utilizado técnicas de biología molecular (ADN recombinante). Se construyó una biblioteca genómica de cADN de *H. contortus*. Tras la obtención de la secuencia completa del gen, el producto amplificado por PCR fue ligado a un vector de clonado. El ADN del plásmido clonado se introdujo en un vector de expresión, con una cola de 6 histidinas, lo que permitió la purificación de la proteína recombinante (rHc23) mediante una columna de Ni-NTA con 100 y 250 mM imidazol. La pureza de la proteína y el rendimiento fueron muy elevados. La proteína mostró un PM aparente ca. 23 KDa [Hc23] tanto en su forma nativa como recombinante; además, en los Western blots se observó una segunda banda de 46 KDa que confirmó su dimerización espontánea, ya que su secuenciación mostró idéntica composición de aminoácidos. La función concreta de la proteína no es conocida. El aminoácido N-terminal de la secuencia fue Metionina (Met), lo que indicó la obtención de la proteína completa. Ambas formas de Hc23, nativa y recombinante fueron empleadas en los ensayos de inmunización frente a la hemoncosis ovina.

En el ensayo vacunal se emplearon 48 corderos de raza Assaf de 4-5 meses de edad; los animales fueron separados de forma estratificada en 6 lotes de 7 corderos sometidos diversos tratamientos, y 1 lote de 6 animales que actuaron como testigos del experimento. El grupo I fue inmunizado con la proteína nativa Hc23 (Hc23) de *H. contortus* en Hidróxido de aluminio, 3 veces, cada 2 semanas, y 2 semanas después de la última dosis fue sometido a una infestación (reto) con 15000 L3 del parásito. El grupo II siguió el mismo protocolo de inmunización e infestación pero utilizando la proteína recombinante rHc23. El grupo III recibió una primera dosis de la proteína nativa en una solución adyuvante que contenía lipopolisacáridos de *E. coli* y *Propionibacterium* spp., 2 días después se repitió la misma inoculación y se procedió a la infestación de los animales; para finalizar, una semana más tarde recibieron una dosis

inmunizante de recuerdo que se repitió a la semana siguiente. En el grupo IV se realizó el mismo protocolo de inmunización e infestación del grupo III, pero empleando proteína recombinante. El grupo V fue el grupo testigo negativo. El grupo VI fue el grupo testigo positivo de la infestación. El grupo VII (con 4 meses y medio de edad) fue primoinfestado con 10000 L3 de *H. contortus*; dicha infestación se terminó el día 35 postinfestación tras un tratamiento antihelmíntico, y 2 semanas más tarde se llevó a cabo la reinfestación (reto) de los animales. El reto parasitario se mantuvo en todos los grupos durante 45 días, para finalmente proceder al sacrificio de los animales.

La inmunización indujo una protección parcial frente a la hemoncosis experimental en los corderos vacunados, donde todos los grupos vacunados, tanto con Hc23 nativa como Hc23 recombinante, mostraron una reducción significativa en la eliminación fecal de huevos, de un 57% en GI, 74% en GII y del 79% en GIII y GIV respecto al grupo primoinfestado (GVI); además de una disminución en la carga parasitaria, desde el 69% para el GI hasta más del 85% para los otros 3 grupos (GII, GIII y GIV). Asimismo, los animales inmunizados mostraron pérdidas sanguíneas inferiores, con valores del hematocrito superiores a los determinados en el grupo primoinfestado. La respuesta eosinofílica periférica guardó relación con el protocolo de inmunización empleado con cada adyuvante, con una notable respuesta de anticuerpos específicos. Los animales del grupo GVII mostraron una reducción de los recuentos de huevos y de la carga parasitaria respecto al grupo GVI; sin embargo, no se apreciaron diferencias significativas con los grupos vacunados.

La protección inducida redujo la carga parasitaria de los corderos y minimizó el efecto patógeno más notable del helminto. La reducción de la eliminación fecal de huevos de *H. contortus* evitó los niveles elevados de huevos en el medio, reduciendo de esta forma el nivel de riesgo ambiental. Por ello, la utilización de Hc23 con ambos adyuvantes empleados puede constituir una herramienta útil de control inmunoproláctico de la hemoncosis. La actividad de la proteína recombinante (rHc23) apunta a su interés como candidato para su desarrollo industrial.

III. SUMMARY

Infections by the abomasal parasitic nematode *Haemonchus contortus* are responsible of important losses of productivity in ruminants particularly sheep. The control of this disease has been largely based on the use of anthelmintics. However, the indiscriminate administration of drugs, lack of strategic planning, drug rotation and unknowledge of the epidemiology of the process have provoked the widespread appearance of anthelmintics resistance. Furthermore, concerns have been raised regarding the presence of pharmacologically active residues both in food for human consumption and in the environment. Therefore, it is necessary to explore new alternative or complementary control methods among them immunoprophylaxis. Under controlled conditions, some proteins have shown to induce protection against *H. contortus* infections. A number of potentially protective hidden antigens (HAGs) of *H. contortus* have been cloned and expressed but limited attempts have been made to clone natural antigens (NAGs).

As a rule, while some native proteins have been able to elicit a significant protective response against haemonchosis their recombinant counterparts fell behind the expectations. However, the economic importance of this parasitic disease, anthelmintic resistance developed in many regions of the world together with the impracticality of immunization with native proteins make necessary the use of recombinant proteins. The aims of our project were the purification of both native (Hc23) and recombinant (rHc23) forms of the protein Hc23 from adult worms since this protein has previously shown to induce a partially protective immune response. In addition the potential immunoprophylactic value against haemonchosis of native and recombinant Hc23, administered with different adjuvants, was tested in experimentally infected lambs.

Two methods have been used to purify the native protein Hc23. The first one was based on the elution of the protein electroblotted to Immobilon P membrane, and the second method was immunoaffinity chromatography. The purification of the Hc23 included an initial step to eliminate the Glutathione-S-Transferase (GST) -an abundant protein found in adult worms that displays a similar molecular weight as Hc23 and that has been shown the lack of immunoprotective effect-. Unbound extract was fractionated by 12.5% polyacrylamide gel electrophoresis under denaturing and reducing conditions (SDS-PAGE) and electrotransferred to Immobilon P. Pieces of membrane containing

the Hc23 were excised and the bound peptide eluted. This method had a poor yield and it was laborious. The second method was based on the use of immunoaffinity chromatography with polyclonal antibodies, purified with protein A agarose, from hyperimmunized rabbits with rHc23. The process developed was quicker, with comparable protein purity and the yield was higher.

Recombinant Hc23 was obtained by DNA recombinant technology. A *H. contortus* cDNA library was produced. The amplified PCR products were ligated to the cloning vector and used to transform competent cells. The positive colonies were selected, and the expression vector was digested. Six histidine-tagged recombinant protein rHc23 was purified with a Ni-NTA agarose column, eluted with 100 and 250 mM imidazole. The protein had a MW ca. 23 KDa [Hc23] (both native and recombinant forms). We observed a second band of 46 KDa this confirming the spontaneous dimerization since their sequences showed identical aminoacid composition. The specific physiological function of the protein is unknown. The N-terminal amino acid is M (Met), indicating that the protein was complete.

In the vaccination trials we have used forty-eight 4-5 month old female Assaf lambs. They were divided in a stratified manner into seven comparable groups consisting of seven lambs each except for the group V (six lambs). Group 1 (GI) were vaccinated with Hc23, group II (GII) with rHc23. Immunizing injections were administered three times with an interval of 14 days between immunizations, in Al (OH)₃ (Aluminium hydroxide) adjuvant. Two weeks after the last immunization, the two vaccinated groups were challenged with 15000 L3 of *H. contortus*. GIII was vaccinated with Hc23, GIV with rHc23 with bacterial immunoestimulant. Immunizing injections were administered four times on day 0 then after 48 hours with the infection with 15000 L3 of *H. contortus*, then after 1 week and the last one after another week, in Lipo-polysaccharide of *E. coli* cells + *Propionibacterium* spp. as adjuvant. In addition, group V (GV) animals were kept as the unvaccinated and uninfected control group until the end of the experiment. The group GVI (GVI) unvaccinated and infected animals were challenged with 15000 L3 of *H. contortus*. Infected and challenged lambs (GVII) received 2 injections of larvae by the oral route, first with 10000 L3 and reinfection with 15000 L3. The first infection was terminated by treating the lambs at the day 35 post infection. At the end of the experimental period (45 days post infection), all animals were slaughtered.

The immunization induced a partial protection in vaccinated lambs in which all vaccinated groups showed a significant reduction in fecal egg counts, 57% in GI, 74% in G II and G III and 79% in GIV compared to primary infected group (GVI) and also significant reduction in abomasal worm burdens, from 69% for the GI to over 85% for the other 3 groups (GII, GIII and GIV) with significantly higher packed cell volumes (PCV) values in all vaccinated groups when compared to the primary infected group. The eosinophilic response was related to the immunization protocol used with each adjuvant with a notable specific antibody response. Animals of the GVII showed also significant reduction in fecal egg counts and worm burdens when compared to the primary infected group (GVI), but without significant differences with vaccinated groups.

Protection induced by immunization reduced the parasite burden of lambs and the most notable pathogenic effect of *Haemonchus*. The notable reduction of faecal egg counts found in vaccinated lambs resulted in a significantly lower parasite contamination of the environment. Results point towards the value of the immunization of lambs with Hc23 with both adjuvants to control lamb haemonchosis. Moreover, the immunizing activity of the recombinant protein (rHc23) makes it an interesting candidate for industrial development.